

DIE DYNAMIK DER VERTEILUNG
EINES STEROIDPHARMAKONS
ZWISCHEN VERSCHIEDENEN
BINDUNGSPROTEINEN IM PLASMA
IN ABHÄNGIGKEIT VON DER
METABOLISIERUNG

Siegmund Braun

1978

Dissertations- und Fotodruck ANNELIESE SCHUBERT
Corneliusstraße 21 • 8000 München 5 • Telefon 268177

Aus dem Institut für klinische Chemie am Klinikum
Großhadern der Universität München
Direktor: Prof.Dr.med. M. Knedel

Die Dynamik der Verteilung eines Steroidpharmakons
zwischen verschiedenen Bindungsproteinen im Plasma
in Abhängigkeit von der Metabolisierung.

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
an der Ludwig Maximilians-Universität zu München



vorgelegt von
Siegmund Braun
aus
München
1978

Mit Genehmigung des Fachbereichs Medizin der Universität München

Berichterstatter: Priv.Doz. Dr. W. Vogt

Mitberichterstatter: Prof. Dr. M. Knedel

Dekan: Prof. Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 20. Juli 1978



Die vorliegende Arbeit wurde unter der Leitung von
Herrn Priv.Doz. Dr. Wolfgang Vogt
in der Zeit vom September 1973 bis April 1977 am
Klinisch-Chemischen Institut des Städt. Krankenhauses
München-Harlaching und am Institut für Klinische Chemie
am Klinikum Großhadern der Universität München
(Direktor Prof. Dr. M. Knedel) durchgeführt.



Digitized by the Internet Archive
in 2026

1.	EINLEITUNG	Seite 1
2.	9 α -FLUORHYDROCORTISON ALS MODELLSUBSTANZ	3
2.1.	Untersuchungen bei Ratte, Meerschweinchen und Hund	4
2.2.	Untersuchungen am Menschen	4
3.	KURZE ÜBERSICHT ÜBER DIE WECHSELWIRKUNG VON STEROIDEN UND PLASMAPROTEINEN	6
3.1.	Steroidbindende Plasmaproteine	6
3.1.1.	Albumin	6
3.1.2.	Spezifische Steroidbindende Glykoproteine	7
3.1.2.1.	Corticosteroid-bindendes Globulin	7
3.1.2.2.	Sexualhormon-bindendes Globulin	8
3.1.2.3.	α_1 -saures Glykoprotein	8
3.2.	Artspezifische Unterschiede der Bindung an Plasmaproteine	9
3.3.	Molekularer Aspekt der Bindung	9
3.3.1.	Art der molekularen Wechselwirkung	9
3.3.2.	Definition und theoretische Ableitung der Bindungsparameter	10
3.3.3.	Einfluß der Molekülstruktur des Liganden auf seine Eiweißbindung	11
3.3.3.1.	Allgemeine Eigenschaften	11
3.3.3.2.	Bindung von Stoffwechselprodukten der Steroidhormone	12
3.3.4.	Beeinflussung der Eiweißbindung durch Stör- faktoren	13
3.3.4.1.	Temperatur	13
3.3.4.2.	pH-Wert, Ionenstärke und Kontaminationen	13
3.3.4.3.	Proteinkonzentration	14
3.3.4.4.	Konkurrenz verschiedener Steroide um eine Bindungsstelle	14
3.4.	Die Bedeutung der Eiweißbindung von Steroid- hormonen und -pharmaka im Plasma	15
3.5.	Methodik der Bestimmung des Eiweißbindungs- verhaltens	18
3.5.1.	Prinzip	18
3.5.1.1.	Dialyse	18
3.5.1.2.	Gelfiltration	18

	Seite
3.5.1.3.	Ultrafiltration 19
3.5.1.4.	Ultrazentrifugation 19
3.5.1.5.	Elektrophoretische Verfahren 19
3.5.1.5.1.	Disk-Elektrophorese im Polyacrylamidgel 20
3.5.1.6.	Isoelektrische Fokussierung 21
3.5.1.7.	Optische Methoden und kernmagnetische Resonanz 22
4.	METHODISCHER TEIL 23
4.1.	Reagentien und Geräte 23
4.1.1.	Polyacrylamidgel Disk-Elektrophorese 23
4.1.1.1.	Reagentien 23
4.1.1.2.	Herstellung der Lösungen und Vorbereitung des Gels für die analytische Disk-Elektrophorese 23
4.1.1.3.	Herstellung der Lösungen für die präparative Disk-Elektrophorese 25
4.1.1.4.	Geräte 26
4.1.2.	Isoelektrische Fokussierung 26
4.1.2.1.	Reagentien 26
4.1.2.2.	Herstellung der Lösungen für die Fokussierung im Dünnschicht-Polyacrylamidgel 27
4.1.2.3.	Herstellung der Lösungen für die Fokussierung im Saccharose-Dichtegradienten 27
4.1.2.4.	Geräte 28
4.1.3.	Ultrazentrifugation 28
4.1.4.	Molekularfiltration 28
4.1.5.	Szintillationsspektrometrie 29
4.1.5.1.	Lösungen 29
4.1.5.2.	Gerät 29
4.2.	Tierversuch - Applikation des Präparates und Gewinnung der Plasmaproben 30
4.2.1.	Substanz: 9 α -Fluorhydrocortison 30
4.2.2.	Versuchstiere 31
4.2.3.	Narkose und Operationstechnik 31
4.2.3.1.	Narkose 31
4.2.3.2.	Operative Eingriffe 31
4.2.4.	Applikation des Präparats 32

4.2.5.	Gewinnung von Untersuchungsmaterial	Seite 32
4.2.6.	Aufbereitung der Proben und Bestimmung der Gesamtradioaktivität	33
4.3.	Bestimmung der Gesamtradioaktivität im Plasma	33
4.3.1.	Probenvorbereitung	33
4.3.2.	Messung der Gesamtradioaktivität	33
4.4.	Bestimmung des nicht-gebundenen Anteils durch Enteweißung mit der Ultrazentrifuge	34
4.5.	Abtrennung der Metaboliten durch Dünnschicht- chromatographie	35
4.6.	Auftrennung der steroidbindenden Proteine	36
4.6.1.	Disk-Elektrophorese im Polyacrylamidgel	36
4.6.1.1.	Analytische Disk-Elektrophorese	36
4.6.1.1.1.	Gelbereitung	36
4.6.1.1.2.	Auftragen der Proben und Durchführung der Elektrophorese	36
4.6.1.1.3.	Auswertung	37
4.6.1.2.	Präparative Disk-Elektrophorese	38
4.6.1.2.1.	Geräteaufbau und Gelbereitung	38
4.6.1.2.2.	Auftragen der Probe und Durchführung der Elektrophorese	39
4.6.1.2.3.	Auswertung	39
4.6.2.	Auftrennung der Proteine durch isoelektrische Fokussierung	40
4.6.2.1.	Isoelektrische Fokussierung im Poly- acrylamidgel	40
4.6.2.1.1.	Gelbereitung und Durchführung der Fokussierung	40
4.6.2.2.	Isoelektrische Fokussierung im Saccharose- Dichtegradienten	42
4.6.2.2.1.	Durchführung der Fokussierung	42
4.6.2.2.2.	Elution und Auswertung	42
5.	ERGEBNISSE UND DISKUSSION	44
5.1.	Wahl der geeigneten Methode	44
5.2.	Erprobung und Anpassung der Methodik an das Trennproblem	45

	Seite
5.2.1.	Disk-Elektrophorese 45
5.2.1.1.	Präparative Disk-Elektrophorese 45
5.2.1.2.	Analytische Disk-Elektrophorese 45
5.2.2.	Isoelektrische Fokussierung 48
5.2.2.1.	Fokussierung im Saccharosegradienten 48
5.2.2.2.	Fokussierung im Dünnschichtgel 49
5.3.	Die Bindung von 9α -Fluorhydrocortison an Plasmaproteine beim Hund 49
5.3.1.	Verteilung von 9α -F auf die einzelnen Plasmaproteinfraktionen 52
5.3.1.1.	Identifizierung der Bindungsproteine durch Disk-Elektrophorese 52
5.3.1.2.	Identifizierung der Bindungsproteine durch isoelektrische Fokussierung 52
5.3.1.2.1.	Nicht-proteingebundene Radioaktivität 54
5.3.1.2.2.	Proteingebundene Radioaktivität 59
5.3.2.	Zeitabhängige Umverteilungsvorgänge bei der Proteinbindung von 9α -F 60
5.3.2.1.	Vergleich von Disk-Elektrophorese und isoelektrischer Fokussierung 60
5.3.2.2.	Kinetik der Bindung an Albumin 63
5.3.2.2.1.	Versuch I 63
5.3.2.2.2.	Versuch II 67
5.3.2.2.3.	Vergleich der beiden Versuche 67
5.3.2.3.	Kinetik der Bindung an AAG 68
5.3.2.3.1.	Versuch I 68
5.3.2.3.2.	Versuch II 68
5.3.2.3.3.	Vergleich der beiden Versuche 68
5.3.2.4.	Gesamtvergleich der Kinetik der Proteinbindung 71
5.4.	Vergleich des zeitlichen Verlaufs der Proteinbindung mit der Metabolisierungs-kinetik von 9α -F 73
5.4.1.	Beschreibung der Metabolisierungskinetik 73
5.4.2.	Der zeitliche Verlauf der Albuminbindung im Vergleich zur Metabolisierung 79
5.4.3.	Der zeitliche Verlauf der Bindung an AAG im Vergleich zur Metabolisierung 79

6.	ZUSAMMENFASSUNG	Seite 84
7.	TABELLARISCHER ANHANG	86
8.	LITERATUR	96
9.	LEBENS LAUF	107

VERWENDETE ABKÜRZUNGEN

9a-F	- 9 α -Fluorhydrocortison
AAG	- α_1 -saures Glykoprotein
CBG	- Corticosteroid-bindendes Protein
dpm	- disintegrations per minute (=Zerfälle pro Minute)
^3H	- Tritium
M	- molar
p.a.	- post applicationem
pI	- Isoelektrischer Punkt
SHBG	- Sexualhormon-bindendes Globulin
T	- Transmission
$t_{1/2}$	- Halbwertszeit
Upm	- Umdrehungen pro Minute
v	- Volumen
w	- Gewicht

1. E I N L E I T U N G

Wechselwirkungen zwischen Steroiden und Proteinen sind seit vielen Jahren Gegenstand zahlreicher Untersuchungen. Eine Vielzahl von Informationen über die Eigenschaften steroidbindender Proteine lieferten die leicht zugänglichen Serumproteine. Ihre physikalisch-chemischen Eigenschaften sind ausführlich untersucht (siehe Übersicht bei 74). Dabei wurden allerdings nur statische Zustände, wie Affinitätskonstanten, die molare Konzentration an Bindungsstellen oder die Anzahl von Bindungsstellen pro Eiweißmolekül bestimmt und angegeben. Solche, meist in vitro durchgeführten Untersuchungen liefern sicherlich wertvolle Erkenntnisse. Sie sind jedoch nur bedingt auf die tatsächlichen Verhältnisse im lebenden Organismus übertragbar.

Dynamische Vorgänge, wie die Zeitabhängigkeit der Verteilung zwischen den verschiedenen steroidbindenden Proteinen und die Einflüsse der Metabolisierungs- und Ausscheidungsprozesse auf die Eiweißbindung wurden von anderen Untersuchern bisher nicht beschrieben.

Eine Erweiterung der Kenntnisse über solche Vorgänge erhöht die Aussage pharmakokinetischer Studien über die Bioverfügbarkeit und die Metabolisierung von Arzneistoffen.

Dynamische Vorgänge bei der Wechselwirkung von Steroiden mit Plasmaproteinen wurden erstmals von unserer Arbeitsgruppe bei einem Humanversuch beobachtet (69).

Innerhalb der elektrophoretisch aufgetrennten Plasmafraktionen treten eindeutige, zeitabhängige Verschiebungen der Bindung eines radioaktiv markierten Steroids (9 α -Fluorhydrocortison = 9 α -F) und seiner Metaboliten auf.

Da sich hier ein Ansatz bot, möglicherweise einen neuen Zugang zu Metabolisierungsprozessen und deren Kinetik zu finden, führten wir die Untersuchungen mit 9 α -F als Modells substanz im Rahmen von Tierversuchen weiter.

Gleichzeitig wurde parallel zu den Proteinbindungsstudien an der Erstellung eines großen, pharmakokinetischen Modells gearbeitet, auf das an dieser Stelle nicht näher eingegangen wird.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Veränderungen des an einzelne Plasmaproteine gebundenen Anteils von Steroiden in Abhängigkeit von der Zeit und damit auch der Metabolisierung mit den in den letzten Jahren bekannt gewordenen elektrophoretischen Trennverfahren zu untersuchen. Als Modellsubstanz diente 9α -Fluorhydrocortison.

Lazu mußten notwendigerweise folgende Stufen beschriftet werden:

- 1) Untersuchungen zur Eignung verschiedener Methoden zur Trennung steroidbindender Plasmaproteine,
- 2) Ermittlung der Eiweißbindung von 9α -F in Abhängigkeit von der Zeit nach i.v. Applikation,
- 3) Vergleich der zu erwartenden Umverteilungsvorgänge mit der Metabolisierungskinetik.

2. 9 α -FLUORHYDROCORTISON ALS
MODELLSUBSTANZ

Stand des Wissens zur Pharmakokinetik von 9 α -F

Unsere Wahl fiel auf 9 α -F, da es als Arzneimittel Verwendung findet und eine Ähnlichkeit mit physiologischen Steroiden aufweist.

Das Mineralocorticoid 9 α -Fluorhydrocortison (9 α -F) wird seit langem zur Substitutionsbehandlung bei Morbus Addison verwendet. Seit einigen Jahren wird es auch zur Behandlung hypotoner und orthostatischer Kreislaufstörungen herangezogen (57).

Gerade wegen der dabei erforderlichen Langzeittherapie war es von besonderem Interesse, Kenntnis über das pharmakokinetische Verhalten der Substanz im Organismus zu erlangen. Dauer und Stärke der pharmakologischen Wirkung werden von den pharmakokinetischen Parametern mitbestimmt, nämlich den Geschwindigkeiten der Resorption (Invasion), Distribution, Metabolisierung und Elimination (17). Die Proteinbindung von Pharmaka kann durch Veränderung der Verteilung in den Zusammenhang der pharmakokinetischen Parameter eingreifen und dadurch Einfluß auf die Wirksamkeit der Substanz nehmen. Dies geschieht einmal durch Änderung der wirksamen Konzentration am Rezeptor und zum anderen durch Veränderung der Eliminationsgeschwindigkeit. Unter den verschiedenen Eliminationsmöglichkeiten hat die chemische Inaktivierung des Pharmakons in der Leber einen besonderen Stellenwert.

2.1. UNTERSUCHUNGEN BEI RATTE, MEERSCHWEINCHEN UND HUND

Nach i.v.-Injektion der ^3H -markierten Substanz fällt die Konzentration der Radioaktivität im Plasma in 2 (Ratten) bzw. 3 Phasen (Meerschweinchen und Hunde) ab.

Die 3 Phasen werden der Elimination des Ausgangsstoffes (HWZ 80 min) und der Metaboliten (HWZ 3,5 bzw. 10 h) zugeschrieben.

Die Ausscheidung der Substanz erfolgt bei Ratten fast ausschließlich mit dem Kot, bei Meerschweinchen und Hunden vorwiegend mit dem Harn (72).

Bei Zugabe von 9a-F zu Ratten- bzw. Hundeblut in vitro stellte sich innerhalb von wenigen Sekunden eine Gleichverteilung des Präparates zwischen Plasma und den zellulären Bestandteilen des Blutes ein (73).

Im in vitro Versuch mit Ratten-, Hunde- und Humanplasma wurde eine Eiweißbindungsquote von 70-79% gefunden. Die Bestimmung des proteingebundenen Anteils in vivo ergab bei Ratten einen um 10%, bei Hunden einen um 34% niedrigeren Wert. Hierbei ist zu berücksichtigen, daß die untersuchten Plasmaproben bei der Ratte 45 min und beim Hund 5 h nach oraler Verabreichung entnommen wurden. Zu diesem Zeitpunkt liegt bereits ein großer Anteil der Radioaktivität als vergleichsweise polare Metaboliten vor, die weniger oder kaum an Proteine gebunden werden (73).

2.2. UNTERSUCHUNGEN AM MENSCHEN (69)

Die Blutspiegelkurve nach i.v. Gabe von 9a-F folgt einer zusammengesetzten, exponentiellen Funktion mit mindestens zwei exponentiellen Gliedern. Die erste Halbwertszeit von ca. 1 Stunde entspricht mit großer Wahrscheinlichkeit grob genähert der Elimination des unveränderten Steroids. Die zweite Halbwertszeit beträgt 4,8 Stunden und repräsentiert den Blutspiegelabfall des Metabolitengemisches. 80% der Substanz sind nach 24 Stunden mit dem Urin ausgeschieden.

Bei einem Probanden wurde die Eiweißbindung und die Verschiebung innerhalb der einzelnen, mittels Kartonelektrophorese aufgetrennten Proteinfractionen in Abhängigkeit von der Zeit und damit der Metabolisierung untersucht. Dabei zeigten sich innerhalb der Proteinfractionen zeitabhängige, starke Verschiebungen der radioaktiv markierten Substanz. Die zeitliche Zuordnung dieser Umlagerungsvorgänge zu den beiden oben genannten Halbwertszeiten korrelierte gut, so daß sie als Ausdruck des Metabolisierungsprozesses diskutiert werden konnten.

3. KURZE ÜBERSICHT ÜBER DIE WECHSELWIRKUNG VON STEROIDEN UND PLASMAPROTEINEN

Dieses Kapitel gibt einen kurzen Überblick über die bisher bekannten Wechselwirkungen von Steroiden und Plasmaproteinen und soll das Verständnis der folgenden Abschnitte erleichtern.

Eine umfassende Darstellung findet sich bei WESTPHAL (74). An dieser Stelle kann lediglich versucht werden, einige im Zusammenhang mit dieser Arbeit wichtige und für die Diskussion der Ergebnisse notwendige Punkte herauszustellen.

3.1. STEROID-BINDEnde PLASMAPROTEINE

Die Eigenschaft Substanzen zu binden, besitzen im Plasma vor allem Albumin und daneben sogenannte spezifisch bindende andere Proteine. Diese spezifischen Trägerproteine sind nach ihrer elektrophoretischen Beweglichkeit entweder α - und β -Globuline oder Präalbumine; sie haben im Gegensatz zu Albumin zwar eine hohe Affinität, aber nur niedrige Bindungskapazität (16).

3.1.1. Albumin

Die reversible Eiweißbindung wurde mit Albumin aufgrund seiner leichten Verfügbarkeit in reiner Form und der guten Stabilität weit ausführlicher untersucht als mit jedem anderen Protein (74). Zudem liegt es auf der Hand, daß körperfremde Stoffe, die dem Organismus z.B. als Arzneimittel verabfolgt worden sind, in erster Linie von Albumin wegen der hohen Kapazität und niedrigen Spezifität gebunden werden.

Beim Menschen besitzt es ein Molekulargewicht von 69.000, einen isoelektrischen Punkt von 4,9 und liegt im Serum in einer mittleren Konzentration von 4,4 g/100 ml vor. Für die meisten Arzneimittel befinden sich eine oder zwei primäre Bindungsstellen auf dem Albuminmolekül.

3.1.2. Spezifische Steroidbindende Glykoproteine

3.1.2.1. Corticosteroid-bindendes Globulin (CBG; Synonym: Transcortin)

In den Jahren 1957 bis 1959 bewiesen Untersuchungen in drei Laboratorien (12 , 14 , 59) die Existenz eines Plasmaproteins, das mit niedriger Kapazität und hoher Affinität Cortisol und andere Nebennierenrinden -Steroide bindet (49). Eine Beschreibung der Isolierung und Charakterisierung von CBG sowie ein Vergleich mit den Ergebnissen anderer Untersucher findet sich bei MULDOON und WESTPHAL (40).

Tabelle 3.1.:

Relative Affinitäten verschiedener Steroide an CBG (nach 49) :		
hohe Affinität für	mittlere Affinität für	niedrige Affinität für
Cortisol	Desoxycorticosteron	Aldosteron
Corticosteron	Cortison	11-Dehydrocorticosteron
11-Desoxycortisol	Tetrahydro-11-Desoxycortisol	Tetrahydrocortisol
Progesteron	Prednison	Dihydrocortison
Prednisolon	Östradiol	Östron
2-Methylcortison	Dehydroepiandrosteron	Triamcinolon
21-Desoxycortisol	Testosteron	Tetrahydro-desoxycorticosteron
	Pregnandiol	Δ^5 -Pregnenolon
		9 α -Fluorcortisol

CBG ist ein Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von 51.700 (40), einem isoelektrischen Punkt bei pH 4 (62) und den elektrophoretischen Eigenschaften eines α 1-Globulins. Im Serum liegt es in einer Konzentration von 35 mg/l vor.

Die Bindung zahlreicher Steroide an CBG wurde ausführlich untersucht (74). Eine Übersicht zeigt die Tabelle 3.1.

CBG bindet Cortisol etwa 6 000 mal stärker als Albumin. Ein Mol CBG bindet ein Mol Cortisol. Die CBG-Bindungskapazität liegt bei 260 μ g Cortisol pro 1 l Plasma und erhöht sich bei Frauen im 10. Schwangerschaftsmonat auf 560 + 82 μ g/l (56) durch Verdopplung der CBG Konzentration auf 70 mg/l.

3.1.2.2. Sexualhormonbindendes Globulin (SHBG)

Dieses Protein bindet die zwei wichtigsten Sexualhormone, Testosteron und Östradiol. SHBG hat eine besondere Affinität zu C-19- und C-18-Steroiden (Androgene und Östrogene) mit einer 17- β -Hydroxyl- und einer Keto- bzw. Hydroxylgruppe an Ring A (24). Es hat keinerlei Affinität für Corticosteron, CBG dagegen bindet auch Östradiol und Testosteron (34).

SHBG ist ein β -Globulin mit einem Molekulargewicht von 115.000 (64); die Konzentration im Serum liegt bei 6,75 mg/l.

9a-F besitzt nach ROSNER (49) auch zum SHBG eine relativ niedrige Affinität.

3.1.2.3. α ₁-saures Glykoprotein (AAG; Synonym: Orosomucoid)

Schon einige Zeit vor der Isolierung von CBG und bevor die Glykoproteinnatur von hochaffinen hormonbindenden Plasmaproteinen erwiesen war, fand man, daß AAG mit Progesteron einen dissoziierbaren Komplex bildet. Seine Bindungsaffinität ist höher, als die zwischen Progesteron und Albumin (63 , 76). Andere Δ^4 -3-keto-Steroidhormone werden ebenfalls gebunden, wobei die Stärke der Assoziation der Polaritätsregel folgt (74).

AAG hat ein Molekulargewicht von 44.100 (74) und

liegt in einer Konzentration von 90 mg/100 ml im Serum vor. Der isoelektrische Punkt wird im Bereich zwischen 2,8 und 3,6 angegeben (50 , 74 , 75).

3.2. ARTSPEZIFISCHE UNTERSCHIEDE DER BINDUNG AN PLASMA- PROTEINE

Die Eiweißbindung einer Anzahl von chemisch und pharmakologisch verschiedenen Substanzen wurde von KURZ und FRIEMEL (33) bestimmt. Kein Plasma der von ihnen untersuchten Tierarten stimmte in seiner Eigenschaft, Arzneimittel zu binden, mit dem menschlichen Plasma vollständig überein. Die Bindungseigenschaften verschiedener Spezies können nicht vorhergesagt werden. Man kann allenfalls bei bekannter Konzentration und Struktur des Albumins gewisse Parallelen erwarten (15). So liegt beim Hund der Anteil der Albuminfraktion bei 43% gegenüber 52 - 62% beim Menschen.

Nach WESTPHAL (74) wurden Corticosteroidbindende Plasmaproteine, in Übereinstimmung mit dem ubiquitären Vorkommen der Nebennierenrinden-Hormone in allen Wirbeltierklassen, bei allen untersuchten Spezies gefunden. Die Aktivität im Plasma von Hunden ist allerdings niedrig (siehe Abschnitt 5.3.1.2.).

3.3. MOLEKULARER ASPEKT DER BINDUNG

3.3.1. Art der molekularen Wechselwirkung

Die Ligand-Protein-Komplexe werden durch nicht-kovalente Bindungen zusammengehalten. Für Wechselwirkungen mit Proteinen werden dabei vier Bindungstypen im allgemeinen als maßgebend betrachtet (28):

- 1) Wasserstoff-Brückenbindung,
- 2) Ionen-Bindung,
- 3) Hydrophobe-Bindung,
- 4) van der Waals-Bindung.

Hydrophobe-Bindungen können sich zwischen großen Anteilen des Steroidmoleküls, dessen Grundstruktur unpolar

ist, und aliphatischen wie aromatischen Seitenketten der Proteine einschließlich der Sulfidgruppen ausbilden. Die Bindung der Steroidhormone an das Humanalbumin sowie an Ribonukleinsäure (RNA) ist hauptsächlich als hydrophobe Bindung aufzufassen (53).

Die Bindungsaffinität wird durch Zahl und Anordnung der elektronenanziehenden und -abstoßenden Gruppen im Steroidmolekül beeinflusst; die sterische Konfiguration ist ein weiterer bestimmender Faktor. Einige Proteine zeigen keinerlei Steroidbindung, andere bilden Komplexe mit Assoziationskonstanten von mehr als 10^9 l/mol. Die Anzahl der Bindungsstellen ist begrenzt. In vielen Fällen konnte nur eine Hauptbindungsstelle pro Proteinmolekül aufgezeigt werden (74).

Allen bekannten Steroid-Protein-Komplexen ist die reversible Art der Bindung gemeinsam, wobei sich das Bindungsgleichgewicht nach dem Massenwirkungsgesetz einstellt.

3.3.2. Definition und theoretische Ableitung der Bindungsparameter

Für die quantitative Beschreibung eines Ligand-Protein-Bindungssystems ist es notwendig, Informationen über die Anzahl der Bindungsstellen n, und die Assoziationskonstante(n) K, zu gewinnen (58).

Die Wechselwirkung zwischen Makromolekül und niedermolekularem Ligand läßt sich durch das Massenwirkungsgesetz beschreiben, wobei angenommen wird, daß beide homogen und univalent vorliegen (47).



[S] = Konzentration des Steroids

[P] = Konzentration des Proteins

Für die Gleichgewichtskonstante K gilt:

$$\frac{k}{k'} = K = \frac{SP}{S \cdot P} \quad \begin{array}{l} k = \text{Assoziationskonstante} \\ k' = \text{Dissoziationskonstante} \end{array}$$

Als spezifisches Bindungsvermögen ν wird die durchschnittliche Anzahl der Moleküle einer Substanz bezeichnet, die von einem Eiweißmolekül gebunden wird (74).

Für die graphische Darstellung der experimentell ermittelten Bindungsparameter wählt man zweckmäßigerweise die von SCATCHARD (51) angegebene Methode, die auch bei Bindungsstellen unterschiedlicher Affinität (gekrümmter Kurvenverlauf) einen relativ genau definierten Wert für K (Gesamtbindungskonstante) liefert.

In komplexen Systemen sind verschiedene Wechselwirkungen möglich, So kann ein spezifisches Bindungssystem mit hoher Affinität und niedriger Kapazität mit einem unspezifischen Bindungssystem von niedriger Affinität und hoher Kapazität konkurrieren. Da hier die Methode von SCATCHARD nur mit großem Vorbehalt anzuwenden ist, haben BAULIEU und RAYNAUD (5) einen "Proportion graph" vorgeschlagen. DAYTON (15) gibt die Bindungsdaten als prozentualen Anteil der gebundenen Substanz bei bestimmten Konzentrationen von Arzneimittel und Protein an. Als Gründe nennt er dafür unter anderem:

- 1) Die Bestimmung der prozentualen Bindung im Plasma kann schnell, bei klinisch relevanten Konzentrationen erfolgen; besonders mit radioaktiv-markierten Arzneimitteln.
- 2) Die üblichen Arzneimittel-Albumin Affinitätskonstanten sind unter thermodynamischen Bedingungen ermittelt, die gewöhnlich im Plasma nicht gegeben sind, da nämlich andere Liganden (einschließlich der Metaboliten) und Makromoleküle als Bindungsproteine noch mit einzubeziehen sind.

3.3.3. Einfluß der Molekülstruktur des Liganden auf seine Eiweißbindung

3.3.3.1. Allgemeine Eigenschaften

Für die Wechselwirkung eines Steroids mit einem Protein können drei Eigenschaften als besonders relevant betrachtet werden:

- 1) elektrische Ladung, falls vorhanden,
- 2) "Polarität", d.h. Summe der polaren Eigenschaften der Substituenten,

3) sterische Konfiguration.

Die meisten natürlichen Steroidhormone und andere Steroide sind ungeladene, d.h. elektrisch neutrale Moleküle. Sie unterscheiden sich in ihrem Gehalt an Sauerstoff-Funktionen (Hydroxy- oder Ketogruppen). Die Betrachtung der Steroid-Protein-Wechselwirkung unter dem Gesichtspunkt der Natur und Anzahl ihrer polaren Gruppen ist sinnvoll, da die thermodynamische Stabilität vieler Steroid-Protein-Komplexe der Polaritäts-Regel unterliegt. Nach dieser Regel vermindert sich die Bindungsaffinität zwischen Proteinen und Steroiden mit steigender Anzahl polarer Gruppen. Zwei Hydroxylgruppen in den drei wichtigen Positionen 11- β -, 17 α - und 21- des Steroidgerüsts und eine Δ^4 -3-Ketogruppe in Ring A sind z.B. für eine optimale spezifische Bindung an CBG erforderlich (27 , 49). Die Δ^4 -3-Ketogruppe hat desweiteren eine besondere Bedeutung für die Bindung an AAG (74).

3.3.3.2. Bindung von Stoffwechselprodukten der Steroidhormone

Nach DAYTON (15) zeigen die Metaboliten fast ausschließlich einen niedrigeren pK_a (negativer Logarithmus der Assoziationskonstante) und eine höhere Polarität als die Muttersubstanz. Die Metaboliten werden somit weniger stark an Proteine gebunden, sind weniger fettlöslich und verdrängen die Muttersubstanz weniger leicht von den Bindungsstellen. Deshalb werden die Metaboliten im allgemeinen vergleichsweise rasch mit dem Urin ausgeschieden.

Die Steroidkonjugate (Sulfate und Glucuronide) liegen beim pH des zirkulierenden Blutes als Anionen vor. Die Bedeutung der Konjugate, speziell der Sulfate, bei der Sekretion und Biotransformation der Steroidhormone ist möglicherweise größer als früher angenommen wurde (6). Ihre Bindung an Plasmaproteine ist deshalb von beträchtlichem, biologischem Interesse. Die Bedeutung der Proteinbindung für die Leberclearance, die biologische Aktivität und andere hormonbezogene Vorgänge wurde bei TAIT und BURSTEIN (61) und von BAIRD et al. (3)

diskutiert.

LEBEAU und BAULIEU (35) fanden für Steroidsulfate eine etwas geringere Affinität zu CBG als für das entsprechende freie Steroid. OERTEL (42) zeigte, daß die Sulfokonjugate, die in vivo nach Injektion von tritiiertem Dehydroepiandrosteron an Versuchspersonen gebildet wurden, sich nach präparativer Zonenelektrophorese in der Albuminfraktion konzentrierten. Neuere elektrophoretische Studien (43) zeigten eine Bindung der Glukuronide an α_1 -Globuline. Dennoch herrscht übereinstimmend die Ansicht, daß Albumin das für die Bindung von Steroidkonjugaten hauptsächlich verantwortliche Protein ist.

3.3.4. Beeinflussung der Eiweißbindung durch Störfaktoren

3.3.4.1. Temperatur

Die Bindungsaffinität zwischen Serumalbumin und verschiedenen Liganden fällt nach KLOTZ (29) mit steigender Temperatur, wenn auch der Effekt unbedeutend ist. Eine ähnliche Beziehung zwischen Temperatur und Assoziationskonstante wurde für die Steroidkomplexe von CBG und AAG ermittelt; bei diesen zwei Serumproteinen ist das Ansteigen der Dissoziation bei Temperaturerhöhung über 37°C allerdings eindeutig (74).

3.3.4.2. pH-Wert, Ionenstärke und Kontaminationen

LEVEDAHL und PERLMUTTER (36) fanden ein kontinuierliches Ansteigen der Assoziationskonstanten des Testosteron-Rinderalbumin-Komplexes zwischen pH 2,3 und 11. Der Anstieg endete abrupt über pH 11, aufgrund des Eintritts der Denaturierung bei pH 11,5. Die maximale Bindungskapazität zwischen Corticosteroiden und CBG liegt bei pH 8. Das gleiche gilt für die Wechselwirkung zwischen Progesteron und AAG.

Die Bindungsaffinität wird besonders zwischen AAG und Progesteron durch die Anwesenheit von Störfaktoren, wie neutrale Salze und Harnstoff beeinflusst. So steigern "salting-out agents" z.B. Na_2SO_4 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, NaCl die Bindungsaffinität. 4 M Kochsalzlösung steigerte auch

die Assoziationskonstanten von verschiedenen Δ^4 -3- Keto-steroiden ganz erheblich. "Salting-in agents", wie z.B. LiBr oder Harnstoff, verringern die Bindungsaffinität; wieder andere zeigen keinerlei Effekte.

Die Bindungsaffinität zwischen AAG und Progesteron wird außerdem ganz erheblich durch Spuren von Schwermetallionen und lipidlöslichen Kontaminationen eingeschränkt (74).

3.3.4.3. Proteinkonzentration

Die Assoziationskonstante des Cortisol-Albumin Komplexes nimmt mit steigender Proteinkonzentration ab. Für diese Beobachtung konnte keine einleuchtende Erklärung gefunden werden. Der umgekehrte Effekt konnte bei der Wechselwirkung von AAG mit verschiedenen Steroiden beobachtet werden (74).

3.3.4.4. Konkurrenz verschiedener Steroide um eine Bindungsstelle

Wenn man hohe Konzentration im Serum und die fast unbeschränkte Fähigkeit des Albumins, kleine Liganden zu binden, betrachtet, erscheint eine Konkurrenz um Bindungsstellen wenig wahrscheinlich. Dagegen spielen z.B. beim AAG solche Phänomene sicherlich eine Rolle. Hier konkurrieren Δ^4 -3-Ketosteroide, wie Corticosteron, Testosteron und Progesteron um diese Bindungsstelle. Das phenolische Steroid Östradiol konkurriert dagegen nicht um diese Bindungsstelle, während es beim SHBG mit Testosteron dieses Verhalten zeigt. Daraus geht die Bedeutung der Δ^4 -3-Ketogruppe für die Wechselwirkung mit AAG hervor.

3.4.1. Die Bedeutung der Eiweißbindung von Steroidhormonen und -pharmaka im Plasma

Die Erforschung der Wechselwirkung von Steroidhormonen mit Plasmaproteinen reicht bis ins Jahr 1934 zurück. Damals zeigte BRUNELLI (10), daß Östron an Proteine gebunden wird. Trotz der langen Beschäftigung mit dieser Fragestellung herrscht auch heute noch keine endgültige Klarheit über die physiologische Bedeutung der Steroid-Protein Wechselwirkung im Plasma (4).

Verschiedene Hypothesen über die Funktion der steroidbindenden Proteine wurden formuliert (41 , 48 , 74). Den steroidbindenden Proteinen können eine Reihe von Funktionen zugeordnet werden, wie Substanztransport, Hormonreservoir und Schutz vor Metabolisierung.

Zunächst wurde der Transportfunktion der Serumproteine im Sinne eines "Lösungsmittels" für die hydrophoben Steroide die größte Bedeutung zugemessen. Es zeigte sich jedoch bald, daß die Steroidhormone bei den im Plasma herrschenden niedrigen Konzentrationen löslich sind. Die bindenden Plasmaproteine erleichtern möglicherweise den Übergang der neu biosynthetisierten Steroidhormone aus den Bildungsstellen in die Kapillaren oder sie durchdringen die Kapillarwände und transportieren die gebundenen Hormone zum Zielort (74). Dafür spricht, daß CBG in Uteruszellen gefunden wurde (39).

Trotzdem wird heute angenommen, daß die Eiweißbindung nicht dem gezielten Transport dient (5), sondern eine Art Reservoirfunktion hat. Im Sinne eines Puffersystems wird aktives Hormon freigesetzt, wenn der Bedarf erhöht ist und andererseits werden die Zielzellen durch die Bindung vor einem Hormonüberschuß geschützt.

Die Bindung von Steroidhormonen an Plasmaproteine bedeutet auch einen Schutz vor Metabolisierung durch Enzyme der Erythrozyten und der Leber (5). Dies zeigt die starke Abhängigkeit der metabolischen Clearance rate von der Konzentration an Bindungsprotein: hohe SHBG- u

und CBG-Spiegel im Plasma bewirken einen Abfall der Clearancerate (66). Deshalb ändert sich auch in den Situationen, bei denen CBG erhöht ist, wie z.B. in der Schwangerschaft, die Verteilungs- und Ausscheidungskinetik von Cortisol (18).

Weitgehend anerkannt ist die Hypothese, daß CBG den Transfer von Corticoiden zu den Zielzellen, den Leberzellen oder den Zellen des Rückkopplungssystems der hypothalamisch-hypophysären Achse kontrolliert. Ob der freie oder der an CBG gebundene Cortisolanteil dabei wirkt und welche Zellen den betreffenden Anteil aufnehmen können, ist jedoch noch unklar. Die meisten Untersucher schreiben diese Rolle dem freien Anteil zu. Andererseits besteht die Möglichkeit, daß gewisse Zellen nur gebundenes Cortisol annehmen können. Ein solcher Mechanismus reguliert z.B. den Transfer von Eisen in die Reticulocyten (16).

Desweiteren ist die Frage, ob die bindenden Proteine als Steroidträger für spezifische biologische Funktionen dienen, noch offen.

Tabelle 3.2.:

Mögliche Rolle oder Bedeutung von Steroid-Trägern im Plasma (16) :

1) Lösungsmittel

- Vehikelfunktion (BENNHOLD, 1926)

2) Genetische Markierung (De MOOR, 1966)

3) Plasmareservoir

- Schutz vor Anlagerung an die Gefäßwände (WESTPHAL, 1961)
- Schutz vor chemischen Angriffen im Plasma (" , ")
- Verhütung übermäßiger Verluste durch die Niere (HEREMANS, 1963)
- Schutz vor Zerstörung in der Leber (SANDBERG, 1964)

4) Kontrollierter Hormontransfer

- ungebundene Konzentration
- Pufferung der ungebundenen Hormonmenge (DAUGHADAY, 1958)
- Konkurrenz zwischen Bindungsstellen im Plasma und in den Zellen (WESTPHAL, 1961)
- Gesamtkonzentration (TAIT und BURSTEIN, 1964)
- Gebundene Konzentration
- Transfer durch Träger zu bestimmten Zellen

3.5. METHODIK DER BESTIMMUNG DES EIWEIßBINDUNGSVERHALTENS

3.5.1. Prinzip

Das Prinzip aller Bestimmungsmethoden beruht darauf, die niedermolekulare, nicht-gebundene von der an makromolekulare Proteinmoleküle gebundenen Substanz zu trennen. Dabei ist zu berücksichtigen, daß die Bindung an das Eiweiß eine niedrige Bindungsenergie besitzt und reversibel ist, die freie mit der gebundenen Substanz im Gleichgewicht steht und die Gleichgewichtseinstellung praktisch momentan erfolgt (38).

3.5.1.1. Dialyse

Der Hauptvorteil der Gleichgewichtsdialyse bei der Messung des Gleichgewichts zwischen freiem und gebundenem Arzneimittel ist ihre thermodynamische Gültigkeit (74). Allerdings ändert sich während der Bestimmung die Arzneimittelgesamtkonzentration. Das ist kein wesentlicher Nachteil der Methode. Dagegen kann die Adsorption eines Arzneimittels an die semipermeable Dialysemembran ein Störfaktor sein, der beachtet werden muß (32).

Eine Sonderform stellt die Rapid Dialysis Technique zur Untersuchung der Assoziationskinetik dar, bei der das Ergebnis bereits nach zwei Minuten ablesbar ist (2).

3.5.1.2. Gelfiltration

Die Trennung erfolgt hier durch ein Molekularsieb (z.B. Sephadex^R), wobei nur das freie Arzneimittel in die Gelmatrix eindringen kann. Die Vorteile des Verfahrens sind a) keine störenden Membraneigenschaften und b) kein Donnan-Effekt.

Eingeschränkt wird die Aussagekraft der Methode durch
1) Dissoziation des Protein-Testsubstanz-Komplexes durch Wechselwirkung kleiner Moleküle mit dem Gel und
2) stärkere Dissoziation der durch Elution verdünnten Proteinlösungen.

3.5.1.3. Ultrafiltration

Wie bei der Dialyse wird hier die niedermolekulare Substanz durch eine semipermeable Membran von den großen Proteinmolekülen getrennt. Während des Filtrationsvorganges kommt es zu einem Anstieg der Eiweißkonzentration und damit zu einem Anstieg der Bindungskapazität; auch die Arzneimittelkonzentration ändert sich. Adsorption an Filter und Siebeffekt sind weitere Störfaktoren.

BATRA beschrieb eine neuartige Filtrationsmethode zur Trennung von freiem und proteingebundenem Progesteron. Diese Methode basiert auf der Annahme, daß hydrophobe (Celluloseester) Membranfilter sehr wirkungsvoll freie (nicht-polare) Steroide aus einer wässrigen Lösung adsorbieren können, jedoch keine proteingebundenen Steroide. Sie bietet den Vorteil, daß der Steroid-Protein-Komplex im Filtrat erscheint und nicht im Filter, sodaß er für weitere Tests, z.B. in Kinetikstudien mit kompetitierenden Steroiden, zur Verfügung steht (4).

3.5.1.4. Ultrazentrifugation

Bei einer Beschleunigung von 150.000 g sedimentieren die Plasmaproteine mit dem gebundenen Arzneimittel, ohne daß es zu einer wesentlichen Sedimentation des frei gelösten Arzneimittels kommt. Bei dieser Methode kennt man praktisch keine relevanten Störungen (52). Es kann deshalb als bestes Verfahren zur Bestimmung des nicht-gebundenen Anteils bezeichnet werden.

3.5.1.5. Elektrophoretische Verfahren

Elektrophoretische Verfahren, wie z.B. Papierstreifen-, Karton-, Stärkegel- oder Polyacrylamidgel-Elektrophorese, sind für eine qualitative Darstellung der Steroid-Protein-Bindung gut geeignet. Die elektrophoretische Beweglichkeit eines Proteins bleibt nach der Bindung eines neutralen Steroids im wesentlichen unverändert (74).

Ihr besonderer Vorzug ist die elektrophoretische Charak-

terisierung der steroidbindenden Komponente. Jedoch lassen sich die Ergebnisse nicht gut quantifizieren. Besonders störend ist die Dissoziation des Steroid-Protein-Komplexes während der elektrophoretischen Wanderung.

Bei der Interpretation der Versuchsergebnisse ist immer der Einfluß der Elektrophoresebedingungen zu berücksichtigen. Hier sind vor allem pH-Wert und Ionenstärke des Puffers, Pufferzusammensetzung, Temperatur und die Eigenschaften des Trägermediums zu nennen.

3.5.1.5.1. Disk-Elektrophorese in Polyacrylamidgel

Bei der Disk-Elektrophorese (44) liegt ein, hinsichtlich pH-Wert, Pufferzusammensetzung und Gelporengröße diskontinuierliches System vor, mit Polyacrylamidgel als Träger.

Drei physikalische Effekte sind für das hohe Auflösungsvermögen der Disk-Elektrophorese verantwortlich (37):

- 1) Der Konzentrierungseffekt in Anwendung der Kontinuitäts- oder Regulationsfunktion nach KOHLRAUSCH (30)
danach werden die Komponenten der Probe vor ihrer Trennung im weitporigen Sammelgel zu schmalen Zonen konzentriert.
- 2) Der Molekularsiebeffekt (60): die einzelnen Moleküle werden auf Grund ihrer Größe (Molekulargewicht) und ihrer Gestalt (Tertiärstruktur) elektrophoretisch getrennt.
- 3) Der Ladungseffekt, durch den die Probenmoleküle nach ihrer elektrischen Nettoladung getrennt werden.

Die aufgetrennten Proteine können entweder in einer analytischen Modifikation durch Anfärbung und Messung der Radioaktivitätsverteilung bei markierten Proteinen oder in einem präparativen Verfahren durch kontinuierliche Elution der durchgewanderten Proteine nachgewiesen werden.

3.5.1.6. Isoelektrische Fokussierung (13 , 46)

Die von VESTERBERG und SVENSSON (68) unter der Bezeichnung isoelektrische Fokussierung in einem natürlichen pH-Gradienten angegebene Methode ist eine Gleichgewichtsmethode, bei der amphoterische Moleküle in pH-Gradienten nach ihren isoelektrischen Punkten (pI) aufgetrennt werden. Die pH-Gradienten werden durch Elektrolyse amphoterischer Puffer-Substanzen (Träger-Ampholyte) gebildet. Bringt man andere amphoterische Moleküle, z.B. Proteine, in ein solches System, so werden diese bis zu bestimmten pH-Bereichen wandern, die ihrem pI entsprechen, an dem sie die Nettoladung Null haben. Verhindert man die Rückdiffusion mit einem angemessenen Feld, können die getrennten Moleküle in extrem scharfen Banden konzentriert werden (46).

Diese Methode gestattet erstens eine genaue Bestimmung des isoelektrischen Punktes auf einfache Art und zweitens eine Trennung von Proteinen nach ihren unterschiedlichen isoelektrischen Punkten, die sowohl analytisch als auch präparativ ausgenützt werden kann.

Drei verschiedene Arten von Stabilisierungsmedien werden bei der Elektrofokussierung hauptsächlich verwendet: Dichte-Gradienten, Polyacrylamidgele und granulierten Gele (22 , 77).

Dünne Polyacrylamidschichten werden vorzugsweise für analytische Läufe verwendet. Aufgrund ihrer Inertheit und dem fast vollständigen Fehlen geladener Gruppen geben solche Gele eine ausgezeichnete Auflösung und die fokussierten Zonen können in situ leicht gefärbt werden. Zur präparativen Anwendung sind Polyacrylamid-Gele weniger geeignet, da die Elution der fokussierten Zonen Schwierigkeiten bereitet.

Für präparative Zwecke werden vor allem Dichtegradienten verwendet.

Granulierte Gele (Sephadex^R) haben den Vorteil, daß das Experiment horizontal in einem offenen System mit voller Zugänglichkeit zum Gelbett während des Laufs durchgeführt werden kann und daß Präzipitate im Gel

- 22 -

festgehalten werden und so die Trennung nicht beeinflussen. Außerdem kann das so fokussierte Protein relativ einfach aus dem Gel eluiert werden.

3.5.1.7. Optische Methoden und kernmagnetische Resonanz

Pharmaka mit Absorptionsspektren im sichtbaren Licht (400 - 800 nm) können bei der Bindung an Proteine eine markante Verschiebung ihrer Absorptionsmaxima aufweisen. Bei Arzneimitteln mit Absorptionsmaxima im UV-Bereich ergibt die UV-Differenzspektroskopie bessere Resultate (58). Die Anwendung der spektrophotometrischen Methode hängt vom Vorhandensein der Δ^4 -3-Ketogruppe im Steroidmolekül ab. Bei der Bindung eines solchen Steroids wird die spezifische Absorption der Δ^4 -3-Keto-Gruppe proportional zur Bindung an das Protein geschwächt (74).

Die ^1H -NMR-Spektroskopie erlaubt, detaillierte Aussagen über den molekularen Mechanismus der jeweiligen Protein-Liganden-Wechselwirkung zu machen(58).

4. METHODISCHER TEIL

4.1. REAGENTIEN UND GERÄTE

Sämtliche Reagentien waren analysenrein.
Soweit nicht anders gekennzeichnet sind alle Reagentien von Fa. Merck, Darmstadt.

4.1.1. Polyacrylamidgel Disk-Elektrophorese

4.1.1.1. Reagentien:

- Acrylamid für die Disk-Elektrophorese (Serva, Heidelberg)
- N,N' - Methylenbisacrylamid (Bis) für die Disk-Elektrophorese (Serva)
- N,N,N',N'- Tetramethyläthylendiamin (Temed) (Serva)
- Ammoniumpersulfat (Serva)
- Riboflavin
- Kaliumhexacyanoferrat III
- Glycin (Serva)
- Tris (hydroxymethyl) -aminomethan
- Phosphorsäure
- 1N Salzsäure
- Saccharose
- Bromphenolblau
- Amidoschwarz 10 B
- Kobalt(II)chlorid
- Kupfersulfat
- Eisessig

4.1.1.2. Herstellung der Lösungen und Vorbereitung des Gels für die analytische Disk-Elektrophorese:

Folgende Lösungen werden benötigt:

Elektrodenpuffer	Saccharoselösung	Kobaltchloridlsg.
Tris 6,0 g	Saccharose 50 g	Kobaltchlorid 5g
Glycin 28,8 g	H ₂ O ad 1000 ml	H ₂ O ad 1000 ml
H ₂ O ad 1000 ml		

Färbelösung

Amidoschwarz 10B 5,0 g
Eisessig 50,0 ml
H₂O ad 1000 ml

Entfärbelösung

Eisessig 20,0 ml
H₂O ad 1000 ml

Stammlösungen (in dunklen Flaschen bei 4°C aufzubewahren)

A

Tris 36,3 g
1N HCL 48,0 ml
Temed 0,46 ml
H₂O ad 100,0 ml
pH 8,8

B

Tris 5,7 g
1M H₃PO₄ 25,6 ml
Temed 0,46 ml
H₂O ad 100,0 ml
pH 6,9

C

Acrylamid 30,0 g
Bis 0,8 g
K₃ Fe(CN)₆ 15mg
H₂O ad 100,0 ml

D

Acrylamid 10,0 g
Bis 2,5 g
H₂O ad 100,0 ml

E

Riboflavin 4,0 mg
H₂O ad 100,0 ml
(nach 4 Wochen erneuern)

F

Ammoniumpersulfat 0,14 g
H₂O ad 100 ml
(kurz vor Gebrauch ansetzen)

G

Saccharose 40,0 g
H₂O ad 100 ml

Arbeitslösungen für die Gele:

Trenngel

Lösung A 5,0 ml
Lösung C 8,6 ml
Lösung F 20,0 ml
H₂O 6,4 ml

Sammelgel

Lösung B 2,0 ml
Lösung E 2,0 ml
Lösung D 5,6 ml
Lösung G 6,4 ml

4.1.1.3. Herstellung der Lösungen für die präparative Disk-Elektrophorese:

Trenngelpuffer-Lösung

36,6 g Tris werden in 50 ml H_2O gelöst, auf pH 8,9 eingestellt und mit 0,23 ml Temed und H_2O auf 100 ml aufgefüllt.

Sammelgelpuffer-Lösung

5,7 g Tris werden in 80 ml H_2O gelöst, mit konzentrierter Phosphorsäure auf pH 6,9 eingestellt und mit 0,46 ml Temed sowie H_2O auf 100 ml aufgefüllt.

Elektrodenpuffer

300 g Glycin + 62 g Tris in 10 l H_2O lösen und 10 mg $CuSO_4$ als Bakteriostatikum zugeben.

Elutionspuffer

15 g Tris in 1 l H_2O gelöst, wird mit konz. HCL auf pH 8,1 eingestellt.

Gegenkammerpuffer

45 g Tris in 1 l H_2O gelöst, wird mit konz. HCL auf pH 8,1 eingestellt.

Acrylamidmonomerenlösung für das Trenngel

30 g Acrylamid + 0,8 g Bis werden in 50 ml H_2O gelöst und mit H_2O auf 100 ml aufgefüllt.

Acrylamidmonomerenlösung für das Sammelgel

10 g Acrylamid + 2,5 g Bis werden in 60 ml H_2O gelöst und danach mit H_2O auf 100 ml aufgefüllt.

Ammoniumpersulfatlösung

280 mg werden in 100 ml H_2O gelöst.

Alle Lösungen werden in dunklen Flaschen im Kühlschrank aufbewahrt, die Ammoniumpersulfatlösung muß immer frisch angesetzt werden. Vor Gebrauch werden die Lösungen entgast.

4.1.1. Geräte:

- BOSKAMP-Makro-Disk-Elektrophorese (Fa. Boskamp, Hersel)
- Standard-Ausrüstung
- BOSKAMP-Pherostat
- 1 Satz Glasschalen
- Aufnahmerahmen für EPPENDORF-Vorschub
- UV-Lampe (Camag, Muttens, Schweiz)
- Magnetrührer
- Photometer: EPPENDORF (Netheler + Hinz, Hamburg)
- UltraPhor, Gerät für Gelelektrophoresen (COLORA, Lorch)
- LKB-1200 Varioperpex Pumpe (LKB-Produkte, Bromma, Schweden)
- LKB-8300 Uvicord II, UV-Photometer und Schreiber
- LKB-3094 PVC-Schläuche (Tygon)
- LKB-7000 Ultrorac Fraktionssammler
- Kryostat (Fa. COLORA, Lorch)
- Mehrzweckaggregat für die Stromversorgung (HIRSCHMANN, München)

4.1.2. Isoelektrische Fokussierung

4.1.2.1. Reagentien:

- Acrylamid (Serva)
- N,N'-Methylenbisacrylamid (Serva)
- Riboflavin
- Saccharose
- Ampholine^R pH 3,5 - 10 (LKB)
pH 9,0 - 11 (LKB)
pH 4,0 - 6 (LKB)
pH 5,0 - 7 (LKB)
pH 2,5 - 4 (LKB)
- 1M NaOH
- 1m H_3PO_4 (hergestellt aus 57,6 ml 85 proz. H_3PO_4 in 1000 ml H_2O)
- Coomassie Brilliant Blue R-250 (Serva)
- Methanol
- Sulphosalicylsäure

- Trichloressigsäure
- Äthanol
- Eisessig
- Aqua dest.

4.1.2.2. Herstellung der Lösungen für die Fokussierung im Dünnschicht-Polyacrylamidgel

Stammlösungen:

A Acrylamid-Lösung 29,1% (w/v)

Acrylamid 29,1 g

H₂O ad 100,0ml

B N,N' - Methylenbisacrylamid (Bis) -Lösung (0,9%)

Bis 0,9 g

H₂O ad 100,0ml

C Riboflavinlösung

Riboflavin 4 mg

H₂O ad 100,0 ml

4.1.2.3. Herstellung der Lösungen für die Fokussierung im Saccharose Dichtegradienten

Elektrodenlösungen (Kathode als obere Elektrode)

Kathodenlösung

1M NaOH 2,5 ml

H₂O 7,5 ml

Anodenlösung

Saccharose 15 g

H₂O 12 ml

1M H₃PO₄ 4 ml

Gradientenlösungen

Dichte Lösung

Saccharose 27 g

H₂O 32,8ml

Ampholine^R 4,2ml

pH 3,5 - 10

Leichte Lösung

Saccharose 2,7 g

H₂O 51,8 ml

Ampholine^R 1,2 ml

4.1.2.4. Geräte:

- LKB 2117.00 Multiphor, Ausrüstung für Elektrofokussierung im Polyacrylamidgel
- UV-Lampe
- pH-Meter (RESEARCH)
- LKB 8100 Elektrofokussiersäule, Volumen 110 ml
- LKB 8121 Gradientenmischer
- LKB 8123 Rührmotor
- LKB 12000 Varioperpex Pumpe
- LKB 7000 Ultrorac Fraktionssammler
- LKB 8300 Uvicord III UV-Photometer
- LKB 6530 Flachbett-Schreiber
- LKB 3371E Power-Supply
- LKB 3094 PVC-Schläuche (Tygon)

4.1.3. Ultrazentrifugation

- analytische Ultrazentrifuge (MOM, Budapest)
 - Titan-Festwinkelrotor
 - Cellulosenitrat-Hülsen, Volumen 12,5 ml
- präparative Ultrazentrifuge (BECKMAN Typ L5-65)
 - Titan- Festwinkelrotor 75 ti
 - Polyallomerröhrchen, Volumen 12,5 ml
- Kochsalzlösung 0,9 proz.
- Kältemischung aus Trockeneis + Methanol

4.1.4. Molekularfiltration System Centriflo^R, Fa. AMICON, Holland

- Membrankonus CF 25
- Polyäthylen Konusträger CS1A
- Polycarbonat Tubus CT 1
- Laborzentrifuge, Fa. HETTICH

4.1.5. Szintillationsspektrometrie

4.1.5.1. Lösungen

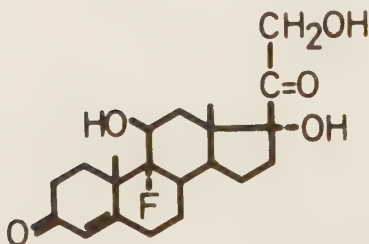
- Szintidioxanlösung:
 - 100 g Naphthalin
 - 7 g PPC
 - 0,5 g POPOP
 - ad 1000 ml mit Dioxan aufgefüllt
- Unisolve^R
- Szintigel-Roth^R

4.1.5.2. Gerät

- LKB-Wallac 8100 Liquid Scintillation Counter
(LKB, Bromma, Schweden)
- Tricarb Sample Oxidizer 305 (Packard, USA)
- Berthold Radiodünnschichtscanner (Berthold, Wildbach)

4.2. TIERVERSUCH - APPLIKATION DES PRÄPARATES UND GEWINNUNG
DER PLASMAPROBEN

4.2.1. Substanz: 9α - Fluorhydrocortison



9α - Fluor- 11β , 17α , 21 -trihydroxy-pregnen-(4)-dion-
-(3,20)

(im folgenden abgekürzt als 9α -F)

Für unsere Versuche stand 9α -F in 1,2-Stellung triti-
ummarkiert, mit einer spezifischen Aktivität von
2,3 mCi/mg, zur Verfügung.⁺

Eine Übersicht über die wichtigsten chemischen bzw.
chemisch-physikalischen Eigenschaften der Substanz
findet sich bei WENZL (72).

+) Wir danken der Fa. Merck für die freundliche Über-
lassung des tritiierten Steroids.

4.2.2. Versuchstiere

Die Versuche wurden an zwei weiblichen Beagle-Hunden durchgeführt.¹ Sie hatten zum Versuchszeitpunkt ein Gewicht von 11,0 kg (Versuch I) bzw. 8,8 kg (Versuch II) und waren in gutem Allgemeinzustand.

4.2.3. Narkose und Operationstechnik

Beide Versuche wurden in Neuroleptanalgesie ausgeführt. Da die Führung der Anästhesie und das operative Vorgehen eine nicht vernachlässigbare Beeinflussung unserer Untersuchungen darstellen, muß im folgenden eine kurze Beschreibung davon gegeben werden.

4.2.3.1. Narkose

Um den Kreislauf möglichst wenig zu beeinflussen wurde die Neurolept-Analgesie gewählt. Als Neuroleptikum wurde N-3-Dimethylaminopropyl-3-propionyl-phenothiazin (Combelen^R)² in einer Dosierung von 0,03 ml/kg KG i.m. verabreicht. 30 Minuten später erfolgte die intravenöse Injektion von Methadon (Polamivet^R)³ über die Vena cephalica. Die Dosierung erfolgte entsprechend der Wirkung und betrug etwa 0,5 - 1 ml/kg. Beide Komponenten wurden während des gesamten Versuchs in diesem Verhältnis in der jeweils erforderlichen Dosierung bei Bedarf nachgegeben. Dabei betrug die gesamte applizierte Menge von Polamivet^R etwa 1,5 - 2,0 ml/kg KG.

4.2.3.2. Operative Eingriffe

Unmittelbar nach Erreichen des Toleranzstadiums wurde ein Vinylan-Katheder über die V. saphena parva bis zur V. cava vorgeschoben und fixiert; er diente während

1) eigene Zucht der Fa. MERCK, Forschungsinstitut
Grafring

2) Bayer, Leverkusen

3) Hoechst, Frankfurt

des Versuchs der Entnahme von venösem Blut und der Infusion eines Plasma-Expanders zur Volumensubstitution (Macrodex^R)⁺.

Anschließend wurde eine Cholecystektomie durchgeführt. Danach wurde in den freipräparierten D.hepaticus ein Vinylkatheter eingebunden. Bei Versuch II wurde ein zweiter Katheter über den distalen Abschnitt des D.choledochus in das Duodenum vorgeschoben. Über diesen konnte die aufgefangene Galle nach Entnahme eines aliquoten Teils für die Analysen und zur Bestimmung des Volumens dem Tier wieder zugeleitet werden.

Vom Beginn der Narkose bis zum Ende des operativen Eingriffs vergingen etwa 90 - 120 Minuten.

4.2.4. Applikation des Präparates

Das tritiummarkierte 9a-F lag in einer 10 proz.alkoholischen Lösung vor und wurde in die cephalica injiziert. Die radioaktive Dosierung betrug bei Tier I 74 $\mu\text{Ci/kg}$, bei Tier II 154 $\mu\text{Ci/kg}$. Entsprechend der spezifischen Aktivität von 2,3 mCi/mg resultierte daraus eine chemische Dosis von 32,2 bzw. 67,0 $\mu\text{g/kg KG}$. Die therapeutische Menge beträgt beim Menschen 1,3 - 4 $\mu\text{g/kg pro Tag}$.

4.2.5. Gewinnung von Untersuchungsmaterial

Blut wurde zu definierten Zeiten aus dem venösen Katheter (Vena saphena) entnommen.

Die aus dem Gallengangkatheter ablaufende Galle wurde in Kunststoffgefäßen mit bekanntem Gewicht in Intervallen von jeweils 30 Minuten aufgefangen und gewogen. Beim Versuch II wurde sie nach dem Wiegen und der Entnahme eines kleinen aliquoten Teils für die Untersuchungen über den Duodenalkatheter dem Tier wieder zugeführt.

+) Knoll, Ludwigshafen

4.2.6. Aufbereitung der Proben und Bestimmung der Gesamtradioaktivität

Das entnommene Blut wurde 1 Minute bei 15.000 g zentrifugiert. 0,1 ml des überstehenden Plasma wurden auf gepreßte Celluloseblättchen getropft und im Tricarb Sample Oxidizer 305 verbrannt. Das entstandene $^3\text{H}_2\text{O}$ wurde absorbiert und die Radioaktivität unter Verwendung eines Toluol-Szintillators (16 g PPO, 1,6 g Dimethyl-POPOP, Toluol ad 1000 ml) im Szintillations-Spektrometer (Fa. PACKARD) gemessen.

Die übrigen Plasmafraktionen wurden in EPPENDORF-Reaktionsgefäße gefüllt, schnell tief gefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C aufbewahrt.⁺

4.3. BESTIMMUNG DER GESAMTRADIOAKTIVITÄT IM PLASMA

4.3.1. Probenvorbereitung

Die tiefgefrorenen Plasmaproben wurden im 25°C warmen Wasserbad innerhalb von 10 Minuten aufgetaut und anschließend für die unten genannten Untersuchungen verwendet.

4.3.2. Messung der Gesamtradioaktivität

Von jeder Plasmaprobe wurden 10 μl entnommen und in Plastiksintillationsfläschchen mit 20 ml Szintidi-oxan vermischt.

Die Impulszählung erfolgte nach Temperatúrausgleich im Szintillationsspektrometer am Balance-Point. Die Standardisierung erfolgte in allen Fällen extern. Die Zählzeit betrug 20 Minuten

+) Dieser Versuch wurde unter Leitung von Dr. Wenzl im Institut für experimentelle Arzneimittelforschung der Firma E. Merck, Grafing bei München durchgeführt.

4.4. BESTIMMUNG DES NICHTGEBUNDENEN ANTEILS DURCH ENTEIWEISUNG MIT DER ULTRAZENTRIFUGE

Zur Bestimmung des freien Anteils von 9a-F und seiner Metaboliten wurde von jeder Plasmaprobe die Restmenge, die nach Durchführung der Gesamtaktivitätsbestimmung, der Disk-Elektrophorese und der isoelektrischen Fokussierung noch verblieb, verwendet. Die Volumina schwankten zwischen 0,1 und 1,5 ml Plasma.

Die Plasmaproben wurden in Cellulosenitrathülsen pipettiert, die mit physiologischer Kochsalzlösung auf 12,5 ml aufgefüllt wurden. Die Zentrifugation erfolgte in einem Titan-Festwinkelrotor bei $+2^{\circ}\text{C}$, 50.000 Upm und dauerte 14 Stunden.

Sofort nach Beendigung des Laufs wurden die Hülsen dem Rotor entnommen und in einer Kältemischung aus Trockeneis und Methanol tiefgefroren. Der eiweißhaltige Bodensatz konnte dann vom eiweißfreien Überstand durch Zersägen abgetrennt werden. Der eiweißhaltige Anteil betrug aufgetaut 1 ml; diese Menge wurde mit 3 ml H_2O und 10 ml Unisolve^R gemischt, wobei ein zur Szintillationsmessung geeignetes Gel entstand. Vom eiweißfreien Anteil wurde ein Aliquot von 1 ml verwendet und ebenso aufbereitet.

Die Messung im Szintillationsspektrometer erfolgte zur Vermeidung der Chemolumineszenz nach 24 stündiger Aufbewahrung im Kühlschrank.

Bei in vitro Versuchen inkubierten wir Hundeserum mit ^3H -9a-F bei Raumtemperatur eine Stunde lang und zentrifugierten anschließend das unverdünnte Serum in der Ultrazentrifuge, wobei das Serum in Polyallomerhülsen gefüllt wurde. Temperatur $+2^{\circ}\text{C}$, 45.000 Upm, Laufzeit 17 Stunden.

Mit einer Pipette wurden aus dem Röhrchen Portionen von jeweils 0,5 ml schichtenweise entnommen und darin die Eiweißkonzentration und die Radioaktivität bestimmt (0,5 ml Serum + 3,5 ml H_2O + 10 ml Unisolve^R).

Parallel dazu wurde vom gleichen Ansatz der freie Substanzanteil durch Molekularfiltration mit dem Centriflo^R-System bei einer Ausschlußgröße des Filters vom Molekulargewicht 25.000 abgetrennt. Dazu wurden 5 ml Serum in die Membranhütchen gefüllt, 10 Minuten bei 2500 Upm zentrifugiert, so daß ca 2 ml Filtrat gewonnen wurde. Von diesem Filtrat wurde ein Aliquot von 1 ml mit 3 ml H₂O und 10 ml Unisolve^R vermischt und später im Szintillationsspektrometer gemessen.

4.5. ABTRENNUNG DER METABOLITEN DURCH DÜNNESCHICHT-CHROMATOGRAPHIE

100 µl Plasma wurden zur späteren Lokalisation der nicht-metabolisierten Substanz mit 10 µl $\neq$ 20 µg einer inaktiven 9a-F - Lösung versetzt und mit 200 µl absolutem Äthanol enteweißet. Der Eiweißniederschlag wurde abzentrifugiert; vom Überstand wurden 2 mal je 50 µl gemessen und 2 mal je 50 µl auf eine DC-Fertigplatte Kieselgel F 254 (Fa. MERCK) in 2 cm breiten Streifen aufgetragen.

Die Platten wurden mit CHCl₃-CH₃OH (70 + 30, V/V) entwickelt.

Nach dem Entwickeln der Platten wurden im UV-Licht die fluoreszierenden Substanzflecke markiert und dann abgekratzt. Das abgekratzte Kieselgel wurde mit 16 ml Szintillationlösung eluiert und die Radioaktivität gemessen.

Auf diese Weise war es möglich, den Anteil der unveränderten Substanz (9a-F) im Plasma zu bestimmen, da die Metaboliten in diesem Fließmittel-System zum großen Teil am Start liegen bleiben (19).⁺

+) Dieser Versuch wurde unter Leitung von Dr. Korb im Institut für experimentelle Arzneimittelforschung der Firma E. Merck, Grafing bei München durchgeführt.

4.6. AUFTRENNUNG DER STEROID-BINDENDEN PROTEINE DURCH:

4.6.1. Disk-Elektrophorese in Polyacrylamidgel

4.6.1.1. Analytische Disk-Elektrophorese im Makro-Disk-Gerät nach FELGENHAUER

4.6.1.1.1. Gelbereitung:

In die Glasröhrchen wird mit der 20 ml Spritze entgaste Trenngellösung bis zur Marke (6 cm hoch) eingefüllt. Um eine glatte Geloberfläche zu erhalten wird mit einer Pasteur-Pipette vorsichtig eine ca 2 mm dicke Wasserschicht auf das Gel aufgebracht.

Die Polymerisation des Gels ist beendet, wenn das Trenngel scharf von der darüber befindlichen Wasserschicht abgetrennt ist (Ausbildung einer scharfen Lichtbrechungskante).

Das überstehende Wasser wird durch Abtupfen mit Filterpapier entfernt. Jetzt kann das frisch hergestellte Sammelgel bis zur oberen Markierung eingefüllt werden. Auch auf diese Gelschicht wird mit der Pasteur-Pipette etwas Wasser aufgebracht.

Zur Polymerisation wird der Röhrchenständer unter eine UV-Lampe gestellt, wobei das Licht senkrecht in die oberen Öffnungen einfallen soll. Nach Beendigung der Polymerisation, die sich durch einen Verlust der Transparenz des Sammelgels anzeigt, wird das überstehende Wasser in der oben beschriebenen Form entfernt.

Bis zur Verwendung am nächsten Tag werden die verschlossenen Röhrchen im Kühlschrank aufbewahrt.

4.6.1.1.2. Auftragen der Proben und Durchführung der Elektrophorese

10 μ l Plasma wurden direkt auf das Sammelgel aufgetragen. Die Röhrchen wurden dann mit einer Mischung aus 50 %iger Saccharoselösung und Lösung B zu gleichen Teilen sowie einer Spur Bromphenolblau bis zur oberen Öffnung gefüllt.

Die außen mit Puffer benetzten Röhrchen wurden in den

Makro-Disk-Einsatz geschoben. In das untere Elektrodengefäß wurde Puffer bis ca 2 cm Höhe eingefüllt und der Einsatz in die Kammer eingesetzt.

In das obere Elektrodengefäß wurde Puffer bis ca 1 cm über die oberen Röhrchenöffnungen eingefüllt.

Der Strom wurde in der ersten Stunde auf 1,0 mA pro Röhrchen eingestellt und stündlich um 0,5 mA pro Röhrchen erhöht.

Die Trennung war beendet, wenn die Bromphenolblaufront ca 0,5 cm über der unteren Röhrchenöffnung angelangt ist (Dauer etwa 3,5 - 4 Stunden).

4.6.1.1.3. Auswertung

Durch vorsichtiges Einspritzen einer wässrigen Glyzerinlösung zwischen Gel und Glasröhrchen wurden die Gelzylinder herausgelöst.

Ein Gelzylinder wurde zur Anfärbung in den Färberahmen gelegt und in die Amidoschwarz 10 B- Lösung gestellt. Die Färbezeit betrug 15 Minuten. Anschließend wurde das Gel unter Verwendung der Spülbatterie 2,5 Stunden in fließendem Wasser gespült und danach 17,5 Stunden in 2 %ige Essigsäure gestellt. Nach einem weiteren Entfärbebad in Kobaltchloridlösung (24 Stunden) konnte das Gel im Auswerterahmen des Photometers densitometrisch ausgewertet werden. Da durch das Färbeverfahren erhebliche Aktivitätsverluste entstanden und zudem ein hoher Quench durch die gefärbten Gele die Radioaktivitätsmessung beeinträchtigte, wurde nur ein Gelzylinder zur Kontrolle gefärbt.

Die restlichen 9 Gelzylinder wurden in 20 je 0,3 cm dicke Scheibchen geschnitten, fraktionsweise in Plastikszintillationsfläschchen gegeben und mit 20 ml Szintidioxanlösung versetzt. Die Proben wurden über Nacht inkubiert (71) und anschließend im Szintillationsspektrometer gezählt.

4.6.1.2. Präparative Disk-Elektrophorese

4.6.1.2.1. Geräteaufbau und Gelbereitung

Nachdem die Trennkammer (für eine Geldicke von 7,5 mm) in das Gehäuse eingesetzt wurde, konnte sie für den Gelguß abgedichtet werden.

Trenngel:	Trenngelpuffer-Lösung	10 ml
	Acrylamidlösung	20 ml
	H ₂ O	10 ml
	Ammoniumpersulfatlösung	40 ml

60 ml dieser Lösung ließ man unmittelbar nach dem Mischen an einem Glasstab unter Vermeidung von Luftblasenbildung an der Wand der Trennkammer einfließen. Um eine glatte Oberfläche zu erreichen, wurde die noch flüssige Gellösung vorsichtig 2-3 mm hoch mit Wasser überschichtet.

Die Gelbildung begann nach ungefähr 15 Minuten und war nach ca 40 Minuten beendet.

Mit einem zusammengefalteten Filterpapier wurde das Wasser von der Geloberfläche abgesaugt.

Sammelgel:	Sammelgelpuffer-Lösung	10 ml
	Acrylamidlösung	20 ml
	Temed	0,05 ml
	H ₂ O	30 ml
	Ammoniumpersulfatlösung	20 ml

30 ml der Sammelgellösung wurden vorsichtig eingefüllt. Die Überschichtung mit Wasser entfiel, dafür wurde der Taschenformer so eingehängt, daß sich dessen Unterkante ca 2,5 cm über dem Trenngel befand. Es durften keine Luftblasen eingeschlossen werden.

Nach Inbetriebnahme des Elutionsaufsatzes wurden die Elutions- und Gegenkammer mit Puffer gefüllt. Jetzt konnte der Elektrodenpuffer unter Verdrängung aller Luftblasen eingefüllt werden und die Kühlung abgeschlossen werden.

4.6.1.2.2. Auftragen der Probe und Durchführung der Elektrophorese

Zunächst wird der Elektrodenpuffer in der Geltasche des Sammelgels mit einer Lösung aus 3 ml Sammelgelpuffer und 150 mg Saccharose unterschichtet. Unter diese Proben-Schutzzone wird dann die eigentliche Probenlösung aus 2,5 ml Serum + 0,35 ml Sammelgelpuffer + 300 mg Saccharose sowie einer Spur Bromphenolblau mit einem dünnen PVC-Schlauch über eine Pumpe eingefüllt; sie darf sich nicht mit dem Elektrodenpuffer vermischen.

Angelegte Spannung und Stromstärke:

im Sammelgel: maximal 20 W (= 200 V , 100 mA)

im Trenngel : " 50 W (= 400 V , 125 mA)

4.6.1.2.3. Auswertung des kontinuierlich gewonnenen Eluats

Elutionsgeschwindigkeit 50 ml/h

Messung im UV-Photometer bei 280 nm

Elutionspuffer als Referenz

Fraktionssammler: alle 6 Minuten Wechsel des Sammelgefäßes

Dauer der Trennung ca 24 Stunden

Zur Messung der Radioaktivität im Eluat wurden von jeder Fraktion 3 ml mit 5 ml H₂O und 10 ml Unisolve^R gemischt und nach 24 Stunden im Szintillationsspektrometer gezählt.

Die Reinigung des Geräts erfolgte mit kaltem Wasser, die Trennkammer wurde mit Aceton gespült und mit einem Papiertuch getrocknet.

4.6.2. Auftrennung der Proteine durch isoelektrische Fokussierung

4.6.2.1. Isoelektrische Fokussierung im Polyacrylamidgel

4.6.2.1.1. Gelbereitung für den pH-Bereich 3,5 - 9,5

Lösung A	10,0 ml
Lösung B	10,0 ml
H ₂ O	36,0 ml
Saccharose	7,5 g
Ampholine ^R pH 3,5-10	2,8 ml
" pH 9 - 11	0,4 ml
" pH 4 - 6	0,2 ml
" pH 5 - 7	0,2 ml

In eine Vakuumflasche geben, gründlich mischen und entgasen. Zuletzt wird zugegeben:

Lösung C	0,4 ml
----------	--------

Diese Gellösung wurde mit einer Pipette in die vorbereitete Polymerisiervorrichtung blasenfrei eingefüllt und im Sonnenlicht oder unter der UV-Lampe polymerisiert.

Nach der Polymerisation mußte die obere Glasplatte der Polymerisierkammer entfernt werden, ohne das Gel zu beschädigen. Nun konnte man auf die Gelplatte die Probe auftragen.

Dazu wurden 10 Filterpapierstückchen (0,5 x 1 cm) mit der Probenlösung (jeweils 20 µl pro Plättchen) durchtränkt und auf die Gelplatte in Höhe der Probenauftragszone gelegt.

An der kathodischen Seite der Gelplatte wurde ein Elektrofokussierungs-Streifen aufgelegt, der vorher mit 1M NaOH durchtränkt wurde; an die anionische Seite kam ein in 1M H₃PO₄ getauchter Streifen. Die Gelplatte wurde nun auf die Kühlplatte des Multiphorgeräts gelegt, der Deckel mit den Elektroden angebracht und der Strom eingeschaltet.

Kühltemperatur +10°C

Spannung	210 V (Start)	1080 V (Ende)
Stromstärke	50 mA (")	28 mA (")
Zeit	110 min.	

Nach beendeter Trennung wurde mit einer Oberflächen-elektrode der pH-Gradient des Gels bestimmt.

Färbung der aufgetrennten Proteine im Gel nach VESTERBERG (67):

Coomassie brilliant blue R-250	0,3 g lösen in
Methanol	75ml und
H ₂ O	186ml. Dann dazugeben
Sulfosalizylsäure	9 g und
Trichloressigsäure	30 g.

In einer Glaswanne auf 60°C im Wasserbad erhitzen.
Die Gelplatte wurde in dieser Lösung 15 Minuten gefärbt.

Entfärbelösung:

Äthanol	250 ml (= 3 Volumenteile)
H ₂ O	650 ml (= 8 Volumenteile)
Eisessig	80 ml (= 1 Volumenteil)

Diese Lösung alle 20 Minuten wechseln, insgesamt 5 mal.

Es wurde jeweils nur ein 2 cm breiter Gelstreifen zur Kontrolle angefärbt. Der Rest wurde in der Tiefkühltruhe bei - 80°C rasch gefroren und konnte so gut in 20 je 0,5 cm breite Streifen parallel zu der Elektroden aufgeteilt werden.

Diese Gelstreifen wurden mit 20 ml Szintidioxanlösung in Plastikfläschchen über Nacht inkubiert und anschließend gezählt.

4.6.2.2. Isoelektrische Fokussierung im Saccharose Dichtegradienten

4.6.2.2.1. Durchführung der Fokussierung

Zunächst wurde die dichte Elektrodenlösung (Anode) mit einer Pipette eingefüllt, danach die im Gradientenmischer gemischte Gradientenlösung mittels einer Pumpe und zuletzt die Kathodenlösung.

Nach Anschluß des Kühlsystems wurde der Strom angeschossen, wobei eine Leistung von 5 W nicht überschritten werden durfte.

Stromstärke 10 mA (Start) 6 mA (Ende)

Spannung 400 V (Start) 700 V (Ende)

Im elektrischen Feld bildete sich nach ca. 24 Stunden der pH-Gradient aus.

Der Strom wurde nun vorübergehend abgeschaltet, ein dünner Schlauch in die Säule, unter möglicher Schonung des Gradienten, eingeführt bis zu der Höhe, an der man die Probe einfüllen wollte (in unserem Fall bei etwa pH 5).

Hier wurde nun soviel Volumen abgesaugt, wie man Probe auftragen wollte. Die Probe (in unserem Fall 0,5 ml Serum) wurde durch Mischen mit einem Teil der herausgepumpten Lösung sowie Zugabe von etwas Saccharose an den Dichtegrad der Auftragsstelle angeglichen und hineingepumpt. Der Schlauch wurde wieder sehr vorsichtig herausgezogen und der Strom weitere 24 - 48 Stunden bis zur Ausbildung scharfer Banden eingeschaltet.

4.6.2.2.2. Elution und Auswertung

Nach beendeter Trennung wurde über den Auslaß am unteren Ende der Säule die Gradientenlösung mit den in ihr aufgetrennten Proteinen langsam durch Eirumpfen von Wasser in den oberen Teil der Säule eluiert und die Transmission über ein angeschlossenes UV-Photometer mit gekoppeltem Schreiber kontinuierlich gemessen. Die Fraktionen wurden im Fraktionssammler in 3 ml großen Portionen gesammelt und sofort ihr pH-Wert bei der gleichen

Temperatur wie in der Säule gemessen (ca. 8°C).

Ein Aliquot (1 ml) der Eluatfraktionen wurde mit 3 ml H_2O und 14 ml Szintigel^R vermischt und nach Temperatúrausgleich im Szintillationsspektrometer gezählt.

5. E R G E B N I S S E U N D D I S K U S S I O N

5.1. WAHL DER GEEIGNETEN METHODEN

Von den in Abschnitt 3.5. aufgeführten Methoden zur Untersuchung der Proteinbindung von Steroiden kamen für uns nur solche in Frage, die außer der allen Methoden gemeinsamen Trennung von freiem und gebundenem Steroid zusätzlich noch die einzelnen Steroid-bindenden Proteine auftrennen. Diese Möglichkeiten bieten elektrophoretische Verfahren und die Gelfiltrationstechnik. Eine exakte Bestimmung von Bindungsparametern, wie z.B. der Assoziations- und Dissoziationskonstanten ist allerdings aufgrund der schlechten Quantifizierbarkeit, die allen diesen Verfahren eigen ist, nicht möglich. Die Gelfiltration ist für derartige Fragestellungen unbrauchbar, da nach WESTPHAL (74) nur Ligand-Protein Komplexe mit hoher Bindungsaffinität wie die der Corticosteroide mit CBG die Gelfiltration ohne vollständige Dissoziation überstehen. Komplexe mit niedrigeren Bindungskonstanten, z.B. jene der Corticosteroide mit Albumin, dissoziieren vollständig, bevor sie das Ende der Gelfiltrationssäule erreicht haben. Die Modifikation der Gelfiltration nach BURKE (11), die die Dissoziation ausschalten kann, konnten wir nicht anwenden, da dies nur über eine starke Erhöhung des Probenvolumens ermöglicht wird und uns solche Volumina nicht zur Verfügung standen.

Wir entschlossen uns deshalb für die elektrophoretischen Verfahren. Aufgrund der erforderlichen hohen Trennleistungen wählten wir die Disk-Elektrophorese in Polyacrylamidgel (37) und die isoelektrische Fokussierung im Dünnschichtgel (46 , 67). Polyacrylamid weist zudem gegenüber Trägermaterialien wie Papier, Cellulose oder Stärkegel entscheidende Vorteile auf: Die Porengröße von Polyacrylamid ist reproduzierbar einzustellen und in weiten Grenzen variabel (32). Adsorption und Elektroosmose spielen für die Trennung keine Rolle (1).

5.2. ERPROBUNG UND ANPASSUNG DER METHODIK AN UNSER TRENN- PROBLEM

5.2.1. Disk-Elektrophorese-Techniken

5.2.1.1. Präparative Disk-Elektrophorese

Zur Bestimmung der Menge des an die einzelnen Plasma-proteine gebundenen, radioaktiv-markierten 9a-F erprobten wir zunächst die Eignung eines präparativen Verfahrens (s. Abschnitt 4.6.1.2.). Der Dissoziation des Bindungskomplexes kann durch die gute Kühlmöglichkeit der Platte (0-2°C) entgegengewirkt werden, was bei der langen Trennzeit von ca. 24 Stunden unbedingt nötig ist. Schwierigkeiten bereitete allerdings die komplizierte, störanfällige Handhabung des Geräts, sowie die bei großem Aufwand enttäuschende Trennleistung (siehe Abb.1).

5.2.1.2. Analytische Disk-Elektrophorese

Bei diesem System werden die Proteine simultan in zehn Gelzylindern aufgetrennt. Die Eiweißfraktionen bleiben im Gel, wo sie beispielsweise durch Färbung nachgewiesen werden können. Die Vorteile dieses Verfahrens bestanden für uns in dem wesentlich geringeren Arbeits- und Materialaufwand, sowie einer weitaus besseren und reproduzierbaren Trennleistung (siehe Abb.2) bei einer Trennzeit von knapp 4 Stunden. Nachteilig wirkte sich hier jedoch die schlechte Kühlmöglichkeit aus, die zu einer Erwärmung während der Trennung und damit zur Förderung der Dissoziation des Bindungskomplexes führte.

Die Gelzylinder mit den getrennten Proteinbanden und dem radioaktiv-markierten Steroid teilten wir nach WARD (71) in 20 Scheibchen und konnten dann anschließend die vorhandene Radioaktivität eluieren. Die Wiederfindungsrate konnte nur angenähert bestimmt werden, indem wir in die flüssige Trenngel-Monomerenlösung 100 µl Serum, das mit 1 µl 1,2-³H-Hydrocortison (2,22·10⁶dpm)

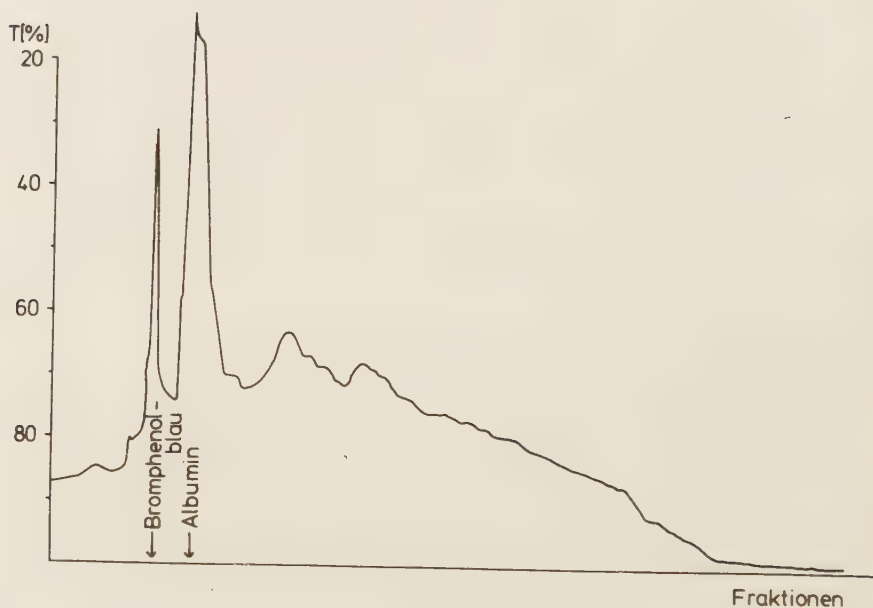


Abb.1: Beispiel einer Auftrennung von Humanserum mit der präparativen Disk-Elektrophorese. Die Auswertung erfolgte durch Messung der Proteinbanden des Eluats im Durchfluß-Photometer bei 280 nm. Die mitgewanderte Bromphenolblaufront diente zur Markierung. Einteilung der Ordinate in Prozent Transmission.

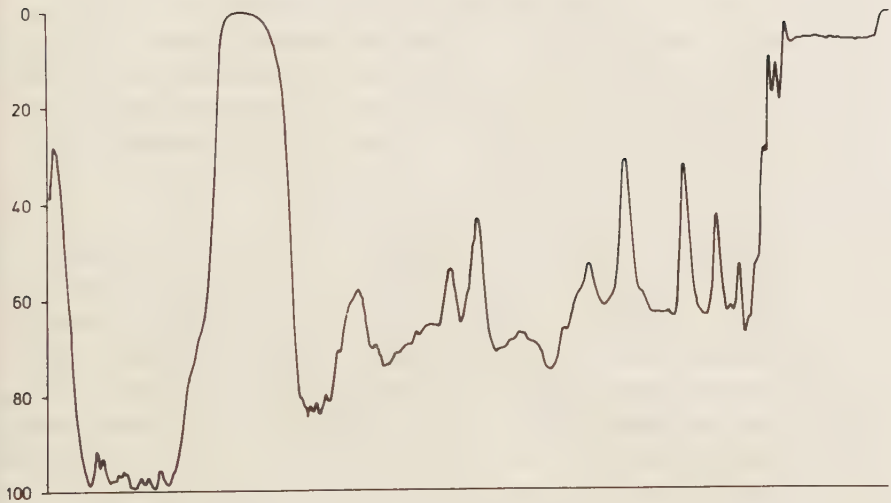


Abb.2: Beispiel einer Auftrennung von Humanserum mit der analytischen Disk-Elektrophorese. Färbung mit Amidoschwarz 10 B. Densitometrische Auswertung bei 578 nm. Einteilung der Ordinate in Prozent Transmission. Sammelgel und Kathode rechts, Fließrichtung nach links.

inkubiert worden war, mischten und damit in der üblichen Weise Geßzylinder gossen. Die polymerisierten, einheitlich radioaktiv-markierten Gele wurden wie angegeben in Scheibchen geschnitten, mit Szintidioxan inkubiert und anschließend im Szintillationsspektrometer gezählt. Die Wiederfindung lag bei 19% und ist vergleichbar mit dem von BOYD und MITCHELL (8) angegebenen Wert von 23% für disk-elektrophoretisch aufgetrennte, ³H-markierte Proteine.

Als Bezugspunkt diente uns bei der Gelzerschneidung die mitgewanderte Bromphenolblaufront. Ein Nachteil des disk-elektrophoretischen Trennprinzips liegt darin, daß Albumin und AAG nicht vollständig getrennt werden (siehe Abschnitt 5.3.1.1.). Beim Schneiden der Gele möglicherweise auftretende kleine Fehler können hierdurch besonders leicht zu einem falschen Ergebnis führen.

5.2.2. Isoelektrische Fokussierung

Wegen der erwähnten unzureichenden Trennung von Albumin und AAG bei der Disk-Elektrophorese, trennten wir die Plasmaproteine außerdem mit Hilfe der isoelektrischen Fokussierung auf. Diese Methode ermöglicht erstens eine hervorragende Trennung und zweitens eine einfache Identifikation der Proteine anhand ihres isoelektrischen Punktes (pI).

5.2.2.1. Isoelektrische Fokussierung im Saccharosegradienten

Die nach ihrem pI aufgetrennten Proteine werden bei dieser Modifikation in einem Saccharosegradienten stabilisiert. Wir verwendeten diese Methode, um neben der Identifikation der Proteinfractionen durch pH-Messung, d.h. die Bestimmung ihres pI, auf einfache Weise eine zweite Bestimmung der eluierten und eingeengten Fractionen durch Immunelektrophorese⁺ durchführen zu können. Die

+) Herrn Priv.-Doz. Dr.med. A. Fateh-Moghadam danke ich für die freundliche Durchführung der immunelektrophoretischen Untersuchungen.

Zuordnung der Proteinfractionen zu bestimmten, durch ihre isoelektrischen Punkte gekennzeichneten Proteine konnten wir damit bestätigen.

Auch dieses Verfahren war für unsere Problemstellung, wegen der Verteilung der Probe in 110 ml Saccharose-lösung und der langen Trennzeit (bis zu 72 Stunden) nur bedingt geeignet.

5.2.2.2. Isoelektrische Fokussierung im Dünnschichtgel

Eine elegante Trennmethode bot sich uns schließlich in der isoelektrischen Fokussierung im Polyacrylamid-Dünnschichtgel. Die einzige technische Schwierigkeit besteht dabei in der Erzeugung eines mechanisch stabilen Gels, das aber trotzdem keinen Molekularsiebeffekt aufweisen darf. In einer solchen Gelplatte konnten wir bei geringem Probeneinsatz und einer kurzen Trennzeit von knapp 2 Stunden eine sehr hohe Trennleistung und Reproduzierbarkeit erreichen. Die Elution der getrennten Proteine gestaltete sich nach Einfrieren des Gels einfach. Damit war diese Methode für unsere Zwecke am besten geeignet.

In letzter Zeit, bereits nach Abschluß des experimentellen Teils dieser Untersuchungen, sind weitere leistungsfähige Modifikationen der isoelektrischen Fokussierung, wie zum Beispiel die präparative Dünnschicht-Elektrofokussierung in einem granulierten Gel, bekannt geworden (77). Inwieweit sie für derartige Fragestellung geeignet sind, ist Gegenstand zukünftiger Untersuchungen.

5.3. DIE BINDUNG VON 9a-F AN PLASMAPROTEINE BEIM HUND

Mit den angegebenen Verfahren konnten wir die Proteinbindung von 9a-F im Plasma von zwei Hunden, denen zu definierten Zeiten nach der Applikation des Präparats Blut entnommen wurde (siehe Abschnitt 4.2.), bestimmen. Dabei interessierte zunächst, an welche Proteine das Steroid gebunden wird, zweitens wie sich die pro-

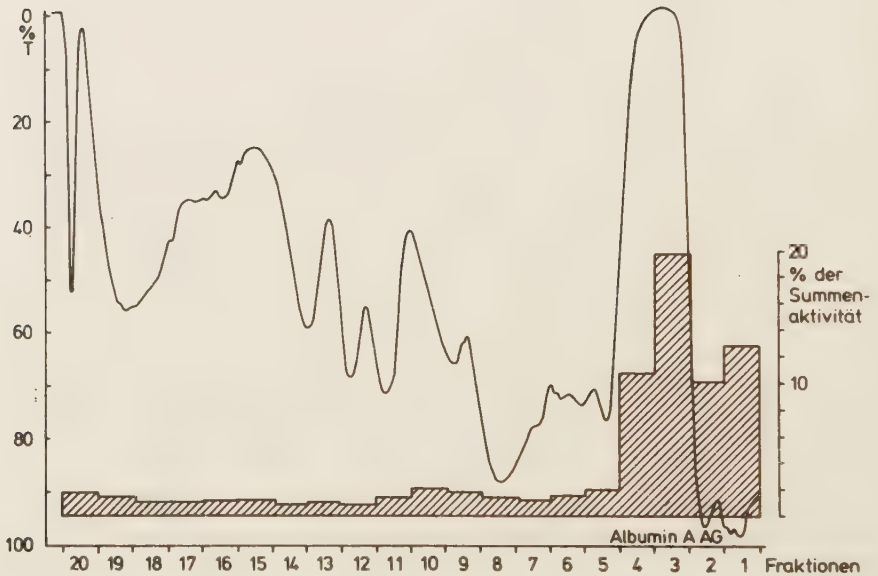


Abb.3: Verteilung der Radioaktivität in den disk-elektrophoretisch aufgetrennten Fraktionen von Hundeserum.

Beispiel aus Versuch II, Entnahmezeit 5 min. nach Applikation von ^3H -9 α -Fluorhydrocortison. Die schraffierten Säulen entsprechen den Radioaktivitätsanteilen in Prozent der Summenaktivität im Gel.

Kathode links, Trennrichtung nach rechts zur Anode.

AAG = α_1 -saures Glykoprotein.

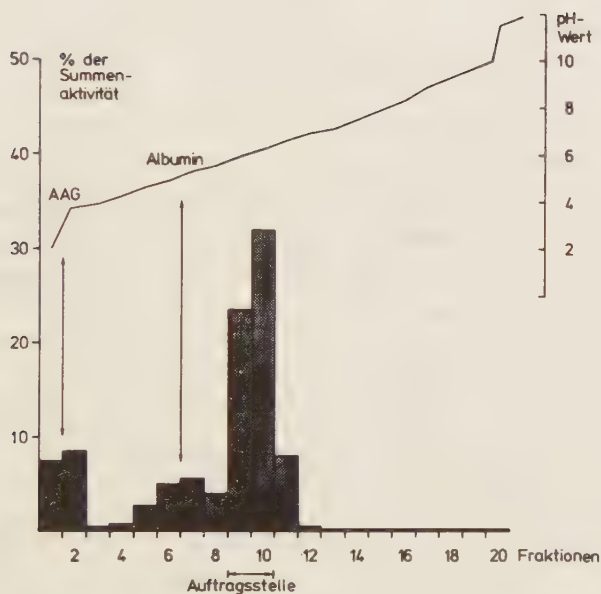


Abb.4: Verteilung der Radioaktivität in den durch isoelektrische Fokussierung aufgetrennten Fraktionen von Hundeserum. Beispiel aus Versuch I, Entnahmezeit 10 min. nach Applikation von ^3H -9aF. Die Kurve oben zeigt den Verlauf des pH-Gradienten im Gel.

Trenndistanz 10 cm. Fokussierung max. 1200 V, max. 30 W, 110 min., Anode links.

zentuale Bindung an die einzelnen Proteine im Lauf der Zeit nach Applikation ändert und schließlich ob eine Beziehung zwischen dieser erwarteten Umverteilung und dem Metabolisierungsprozeß besteht.

5.3.1. Verteilung von 9a-F auf die einzelnen Proteinfractionen

Im folgenden soll die von uns gefundene Bindung von 9a-F an Proteinfractionen des durch isoelektrische Fokussierung und Disk-Elektrophorese aufgetrennten Hundeplasmas dargestellt werden.

5.3.1.1. Identifizierung der Bindungsproteine durch Disk-Elektrophorese

In den gesamten von uns untersuchten Plasmaproben der beiden Versuchstiere fanden wir in 4 Gelfractionen Aktivitätsgipfel bis zu insgesamt 50% der Summenaktivität im Gel, während der Aktivitätsanteil in den übrigen 16 Einzelfractionen sowie der Aktivität im Sammelgel jeweils unter 4% blieb.

Die Zuordnung dieser Aktivitätsverteilung zu einzelnen Eiweißfractionen erfolgte durch Vergleich mit einem angefärbten und densitometrisch ausgewerteten Gelzyylinder (siehe Abschnitt 4.6.1.1.3. , Abb.3).

Ein Vergleich mit dem von MAURER (37), HOFFMEISTER (23) und KRIEG (31) angegebenen Proteinspektrum zeigt, daß sich in diesem Bereich nur Albumin, α_1 -saures Glykoprotein und Präalbumin findet. Eine wesentliche Bindung an weitere Proteine trat also nicht auf.

5.3.1.2. Identifizierung der Bindungsproteine durch isoelektrische Fokussierung

Wir fanden bei allen untersuchten Proben über 90% der Radioaktivität in nur 3 Bereichen mit folgenden pH-Werten (Abb. 4):

- 1.) Bereich um pH 3
- 2.) Bereich um pH 5 (4,8 - 5,2)
- 3.) Bereich um pH 6 (entspricht der Auftragsstelle)

In diesen Bereichen verteilen sich auf Grund ihres isoelektrischen Punktes folgende Proteine, die wir durch Immunelektrophorese bestätigen und durch Angaben aus der Literatur belegen konnten:

- 1.) um pH 3 : α_1 -saures Glykoprotein (AAG);
- 2.) um pH 5 : Albumin.

Für AAG wird in der Literatur ein pI-Wert von 2,7 angegeben (74). Varianten des AAG haben pI-Werte zwischen 3,0 und 3,6 (50). Albumin hat einen pI von 4,9 (45). Diese pI-Werte beziehen sich alle auf Humanproteine. Isoelektrische Punkte von Hundeserumproteinen waren in der uns zugänglichen Literatur nicht angegeben. Unter der Annahme, daß keine wesentlichen Unterschiede zwischen den pI-Werten für Human- und Hundeserumproteine auftreten, werden im folgenden die bekannten Werte für Humanproteine verwendet.

Albumin ist allgemein auf Grund seiner hohen Konzentration und damit hohen Kapazität, sowie seiner niedrigen Spezifität zur Bindung körperfremder Substanzen fähig (siehe Abschnitt 3.1.). Die Bindung an AAG ist dagegen eher spezifisch, wobei die ⁴-3-keto-Gruppe für die Wechselwirkung eines Steroids mit AAG wichtig ist (74).

Auffallend ist, daß wir im Bereich von pH 4, der dem isoelektrischen Punkt von CBG entspricht, nur einen minimalen Anteil an der Gesamtaktivität fanden. Dieses Ergebnis kann dadurch erklärt werden, daß erstens bei Hunden die CBG-Aktivität im Vergleich zum Menschen wesentlich geringer ist. WESTPHAL (74) gibt für Cortisol einen Wert von 6,5 $\mu\text{g}/100 \text{ ml}$ beim Hund, und im Vergleich dazu beim Menschen von 22,0 $\mu\text{g}/100 \text{ ml}$ an. Zweitens muß außerdem berücksichtigt werden, daß die Bindungsaffinität von CBG für 9a-F wesentlich niedriger ist als jene für Cortisol (siehe Tabelle 3.1.in Abschnitt 3.1.2.).

5.3.1.2.1. Nicht-proteingebundene Radioaktivität

Vergleich der Ergebnisse der isoelektrischen Fokussierung mit anderen Untersuchungen

Die an der Auftragsstelle gefundene Aktivität entspricht nach unseren Untersuchungen (dieselbe Kinetik fanden wir auch für die Auftragsstelle der Disk-Elektrophorese) dem freien, nicht-proteingebundenen Anteil des Steroids. Außerdem entspricht der zeitliche Verlauf dieser Aktivität den von unserer Arbeitsgruppe (69) beim Menschen und mit einer anderen Methodik (Kartonelektrophorese) angegebenen Werten (Abb.5,6,7).

Die Untersuchungen in der Ultrazentrifuge konnten nicht verwertet werden, da eine hohe Adsorption an die verwendeten Cellulosenitrathülsen auftrat und für eine Wiederholung in indifferenten Polyallomerhülsen kein Serum mehr zur Verfügung stand.

In in-vitro Versuchen sowohl mit 4%iger Rinderalbuminlösung als auch unverdünntem Humanserum untersuchten wir durch Ultrazentrifugation in Polyallomerhülsen im Vergleich zur Molekularfiltration nach Zugabe von ^3H -9a-F dessen freien Anteil. Mit der Ultrazentrifugation fanden wir für unverdünntes Humanserum unter diesen Bedingungen einen freien Anteil von 35%. Die Vollständigkeit der Enteiweißung des Serums wurde durch schichtweise Bestimmung der Proteinkonzentration in den Zentrifugenhülsen überprüft (s.Abb.8). Die mit einem wesentlich geringeren Aufwand verbundene Molekularfiltration (Centriflo^R) erbrachte bei Mehrfachansätzen Werte zwischen 21 und 32 %, die wahrscheinlich aufgrund von Adsorption an das Filtermaterial geringfügig niedriger lagen. Diese einfache und schnelle Methode stand uns zum Zeitpunkt des Hauptversuchs noch nicht zur Verfügung.

Rinderserumalbumin (4%ig) zeigte bei den vorgenannten Versuchen eine um 25% niedrigere Bindungskapazität als Humanserum, was unter anderem auf eine Bindung an weitere Serumproteine hinweist.

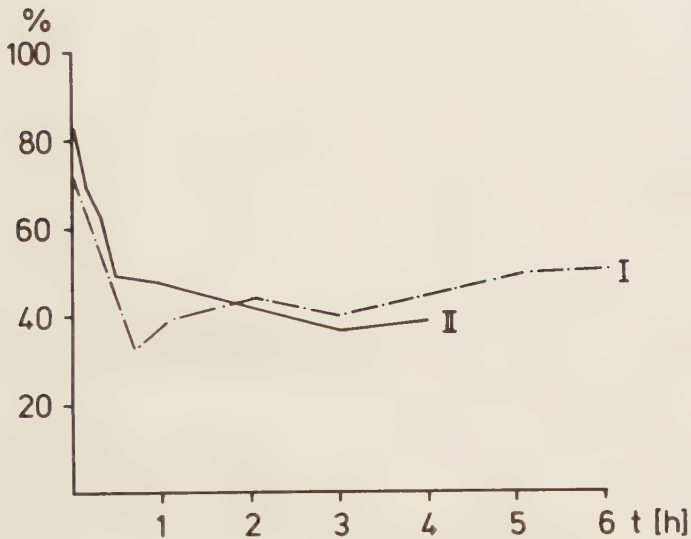


Abb.5: Prozentualer Anteil der nicht-proteingebundenen Radioaktivität an der Gesamtaktivität in Abhängigkeit von der Zeit nach Applikation von ^3H -9aF.

Vergleich der Ergebnisse von elektrofokussierten Hundeseren aus Versuch I und II. Als nicht-gebundener Anteil wurde die an der Auftragsstelle verbliebene Radioaktivität gewertet.

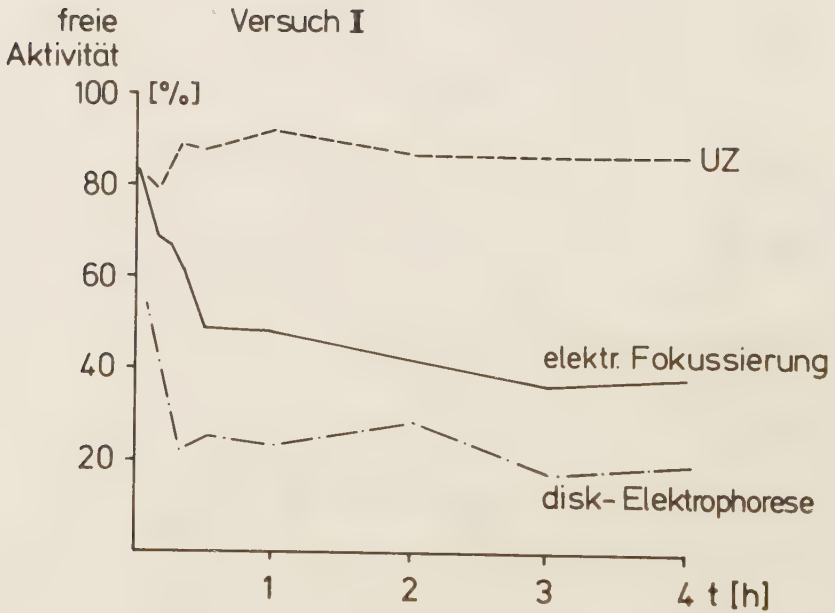


Abb.6: Prozentualer Anteil der nicht-proteingebundenen Radioaktivität an der Gesamtaktivität im Serum. Vergleich der einzelnen Bestimmungsmethoden. Hundeseren aus Versuch II. UZ = präparative Ultrazentrifugation in Cellulosenitrathülsen. Zur Kritik an den verwendeten Cellulosenitrathülsen siehe Abschnitt 5.3.1.2.1.

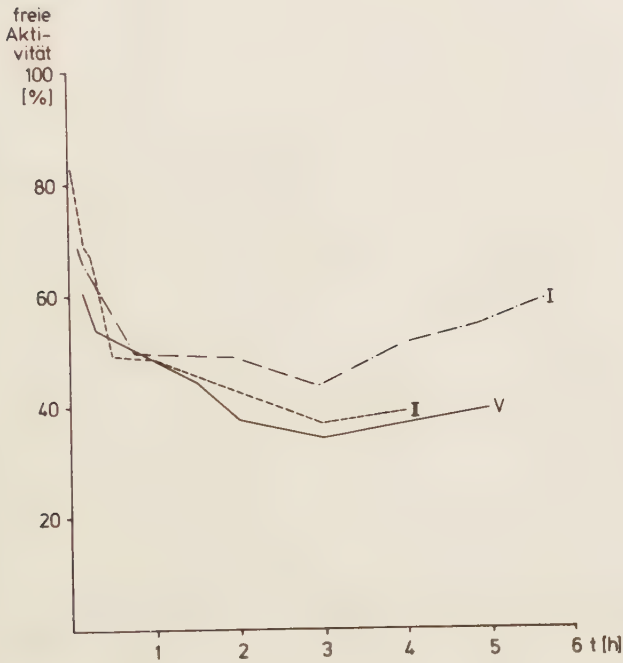


Abb.7: Prozentualer Anteil der nicht-proteingebundenen Radioaktivität an der Gesamtaktivität im Serum. Vergleich der Ergebnisse von elektrofokussierten Hundeseren aus Versuch I und II mit den von VOGT (69) durch Kartonelektrophorese aufgetrennten Humanseren (V).

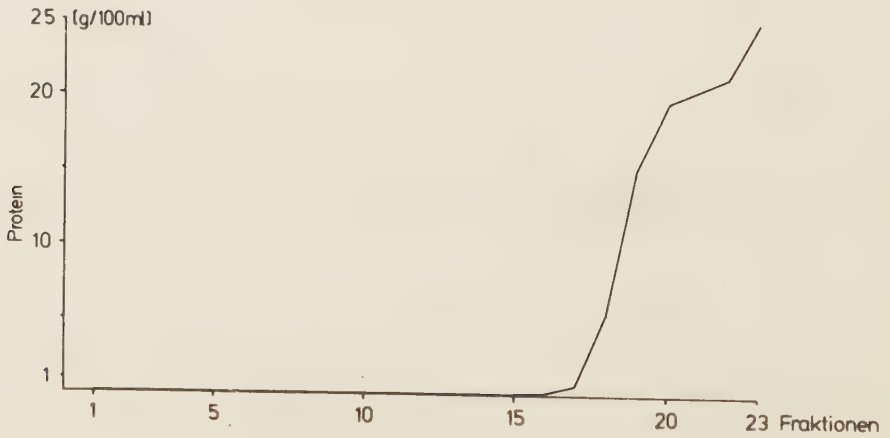


Abb.8: Enteiweißung mit der Ultrazentrifuge. Verteilung der Eiweißkonzentration innerhalb einer Zentrifugenhülse.

5.3.1.2.2. Proteingebundene Radioaktivität

Brauchbarkeit der isoelektrischen Fokussierung für Proteinbindungsstudien

Die Voraussetzung für die Zuordnung der in den Gelfraktionen gefundenen Radioaktivität zu den an diesen Stellen fokussierten Proteinen ist, daß der Komplex aus ^3H -9a-F und bindendem Protein während der Auftrennung stabil bleibt und daß keine Bindung von Steroiden oder Proteinen an Trägerampholyte erfolgt (7). WESTPHAL weist in neueren Untersuchungen darauf hin, daß bei Elektrofokussierung im Saccharosegradienten bei $+10^\circ\text{C}$ aufgrund der Dissoziation des Steroid-Protein-Komplexes die Lokalisation des radioaktiv-markierten Steroids mit der tatsächlichen Bindungsaffinität nicht übereinstimmte. Das Progesteron-bindende Globulin wurde bei pH 2,8 fokussiert, während radioaktiv markiertes Progesteron bei pH 4,6 und pH 3,5 gefunden wurde. Eine Wiederholung des Experiments bei $+2^\circ\text{C}$ erbrachte eine Übereinstimmung der Bindungsaffinität mit der Lokalisation der Radioaktivität (75). Allerdings kann auch in unseren Arbeiten eine Dissoziation des Steroid-Protein-Komplexes nicht vollständig ausgeschlossen werden, da wir die Fokussierung ebenfalls bei einer Temperatur von $+10^\circ\text{C}$ durchführten. Im Gegensatz zu WESTPHAL wandten wir jedoch die Fokussierung im Dünnschichtgel an, wodurch wir wesentlich kürzere Trennzeiten benötigten und zweitens die Plasmaproben keiner Verdünnung in Saccharoselösung aussetzen mußten (siehe Abschnitt 4.6.2.). Die Dissoziationsmöglichkeiten waren also wesentlich verringert. Außerdem spricht die Lokalisation der Radioaktivität gerade im Bereich des in dieser Hinsicht empfindlichen AAG ebenfalls gegen eine starke Dissoziation des Komplexes.

Eine andere Problematik, die sich bei der Interpretation der Steroid-Protein-Bindung ergibt, wenn sie mit der isoelektrischen Fokussierung untersucht wird, ist die von VAN BAELEN und DE MOOR (62) angegebene Unfähigkeit von menschlichem Transcortin (= CBG) am

isoelektrischen Punkt Cortisol zu binden, wogegen Sial-säure-freies Transcortin (Asialotranscortin) mit einem pI von 5,4 und 5,6 diese Fähigkeit zeigt. Dies könnte eine zusätzliche Erklärung für die von uns gefundene minimale Bindungsaffinität am isoelektrischen Punkt von CBG beim Hund bieten.

Desweiteren zeigt Asialotranscortin eine Änderung seiner Ladung, wenn es Cortisol bindet. VAN BAELEN et al. fokussierten den Bindungskomplex bei pH 5,2 und 5,4, während sie das ligandenfreie Asialotranscortin bei pH 5,4 und 5,6 eluierten (65).

5.3.2. Zeitabhängige Umverteilungsvorgänge bei der Proteinbindung von 9a-F:

5.3.2.1. Vergleich von Disk-Elektrophorese und isoelektrischer Fokussierung:

Beim Vergleich der Summenaktivitäten der aufgetrennten Plasmaproben mit der direkt im Plasma gemessenen Gesamtaktivität, zeigte die isoelektrische Fokussierung eine sehr gute Übereinstimmung mit einer Wiederfindungsrate bis zu 85%. Bei der Disk-Elektrophorese fällt vor allem bei den Plasmaproben innerhalb der 1.Stunde nach Applikation des Steroids eine starke Diskrepanz zur Gesamtaktivität auf (siehe Abb.9,10).

Die bei der Disk-Elektrophorese aufgetretenen Aktivitätsverluste führen wir darauf zurück, daß hier die Plasmaproben an der Auftragsstelle in einer Lösung aus Sammelgelpuffer und Saccharose verdünnt werden, wodurch eine stärkere Dissoziation auftritt. Da das Maximum der Bindungsfähigkeit von CBG und AAG bei pH 8 liegt (74), dürfte durch den pH von 6,9 im Sammelgelpuffer eine weitere Förderung der Dissoziation erfolgen. Da außerdem die eingefüllte Probe noch von Elektrodenpuffer überschichtet wird, besteht die Möglichkeit, daß freies ³H-9a-F in diesen Raum diffundieren kann.

Die von uns benutzte Methode der isoelektrischen Fokussierung mit einer Platte aus Dünnschicht-Polyacrylamidgel war frei von solchen Störungen, da die Proben

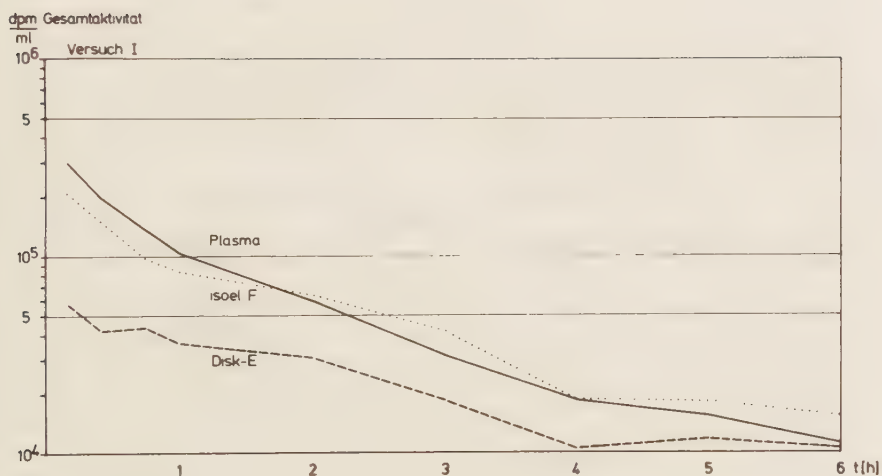


Abb.9: Verlauf der Gesamtaktivität nach Applikation von ³H-9aF. Vergleich der gemessenen Aktivität im Nativplasma mit den Summenaktivitäten in den durch isoelektrische Fokussierung und Disk-Elektrophorese aufgetrennten Fraktionen bei Versuch I.

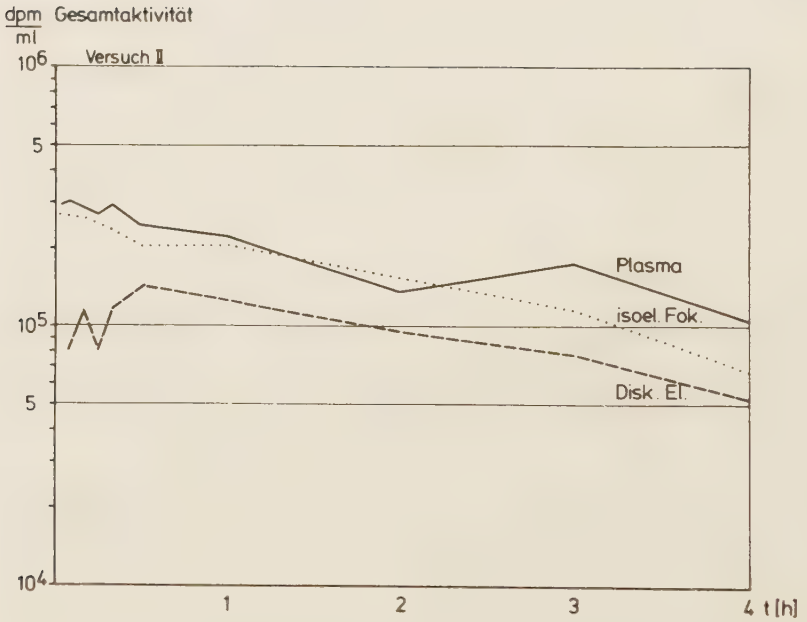


Abb.10: Verlauf der Gesamtaktivität nach Applikation von ^3H -9aF. Vergleich der im Nativplasma gemessenen Aktivität mit den Summenaktivitäten in den durch isoelektrische Fokussierung und Disk-Elektrophorese aufgetrennten Fraktionen bei Versuch II.

in Filterpapierstückchen direkt auf das Gel aufgetragen werden (siehe Abschnitt 4.6.2.1.).

Die Lage der Auftragsstelle hat auf das Trennergebnis keinen Einfluß. Bei in-vitro Versuchen, in denen wir mit ^3H -9a-F inkubiertes Hundeserum an 5 verschiedenen Stellen des Elektrofokussiergels auftrugen, zeigte sich immer die gleiche Radioaktivitätsverteilung im Gel. Um Überlagerungen mit möglichen Bindungsproteinen zu vermeiden und um die Laufstrecke kurz zu halten wählten wir die Mitte der Gelplatte (bei pH 6) als Auftragsstelle.

Die Änderung der an die Plasmaproteine gebundenen Radioaktivitätskonzentration in Abhängigkeit von der Zeit wird deshalb im folgenden mit den durch isoelektrische Fokussierung erhaltenen Meßwerten gezeigt (s. Abb.11).

5.3.2.2. Kinetik der Bindung an Albumin

5.3.2.2.1. Versuch I (enterohepatischer Kreislauf ausgeschaltet)

Die Albuminbindung beim Versuchstier I zeigte einen charakteristischen Verlauf in 3 Phasen. Zunächst fällt die Aktivität mit einer Halbwertszeit von 18 min. von 28150 dpm/ml bei 10 min p.a. steil auf 4400 dpm/ml bei 60 min., sinkt dann bis zur 240 min. langsam auf 2200 dpm/ml und steigt schließlich wieder etwas an bis auf 2850 dpm/ml bei 360 min.

Der relative Anteil der an Albumin gebundenen Aktivität im Vergleich zur Gesamtaktivität im Gel fällt zunächst von 13,7% bei 10 min. auf das Minimum von 5,3% bei 60 min., nimmt danach bis zur 180 min. geringfügig zu bis 6,9% und steigt anschließend nahezu kontinuierlich bis auf 18,4% bei 360 min. Dieser Anstieg nach der 240 min. findet sich auch bei der von unserer Arbeitsgruppe (69) beim Menschen mit einer anderen Methodik ermittelten Eiweißbindung von 9a-F (Abb.14).

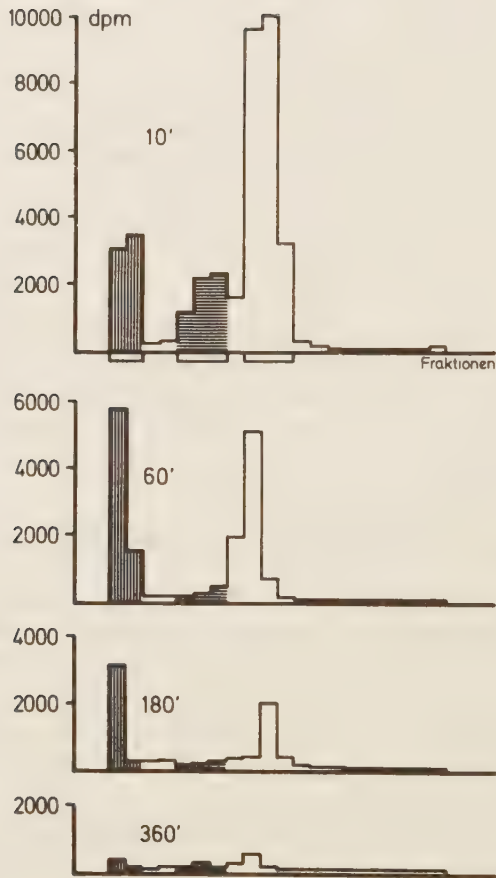


Abb.11: Isoelektrische Fokussierung von Hundeseren aus Versuch I. Die Abbildung zeigt die Radioaktivitätsverteilung im Gel zu verschiedenen Zeiten (von 10 bis 360 min.) nach Applikation von ^3H -9aF. Vertikal schraffierte Säulen entsprechen dem AAG-Bereich, horizontal schraffierte Säulen dem Albumin-Bereich und nicht schraffierte Säulen der Auftragstelle.

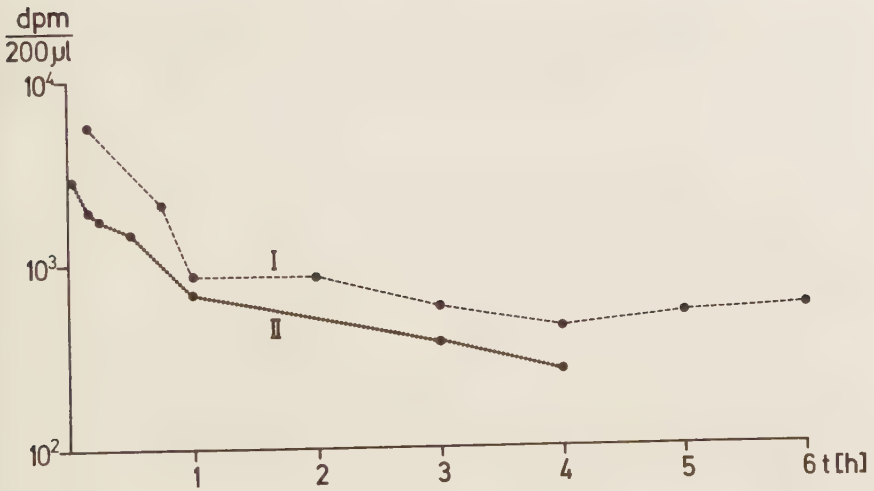


Abb.12: Verlauf der an Albumin gebundenen Radioaktivitätsmenge in Abhängigkeit von der Zeit bei Versuch I und II. Auftrennung der Plasmaproteine durch isoelektrische Fokussierung.

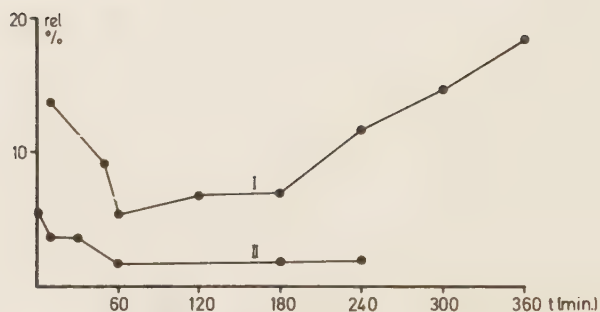


Abb.13: Relativer Anteil der an Albumin gebundenen Radioaktivität in Prozent der Gesamtaktivität bei Versuch I und II.

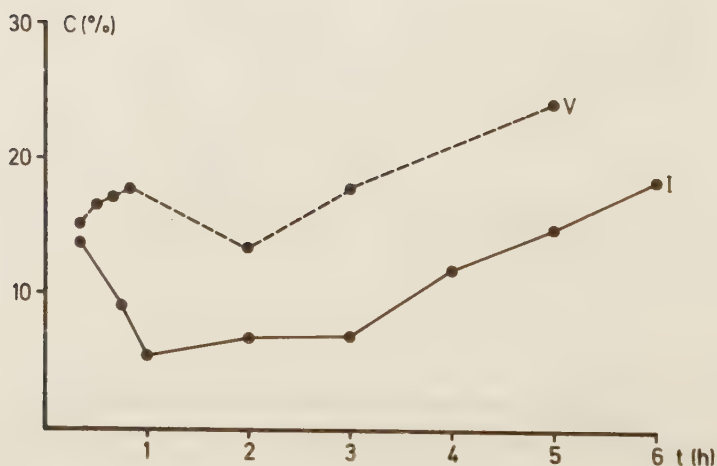


Abb.14: Verlauf der an Albumin gebundenen Radioaktivität. Angaben in Prozent der Gesamtaktivität. Vergleich der Ergebnisse von elektrofokussierten Hundeseren aus Versuch I mit den von VOGT (69) durch Kartonelektrophorese aufgetrennten Humansen (V).

5.3.2.2.2. Versuch II (enterohepatischer Kreislauf wiederhergestellt)

Bei diesem Versuch konnten Blutproben nur bis zur 240.min.p.a. entnommen werden. Es zeigen sich dabei zwei Phasen der Albuminbindung:

Ausgehend von 14400 dpm/ml bei 2 min. p.a. fällt die Aktivität mit einer Halbwertszeit von 27 min. steil auf 3450 dpm/ml bei 60 min. Danach verringert sich die Aktivität langsamer bis auf 1300 dpm/ml bei 240 min. Der relative gebundene Anteil fällt von 5,4% (2 min. p.a. auf 1,7% (60 min. p.a.). Anschließend bleibt dieser Anteil nahezu gleich und beträgt 240 min. p.a. 1,9%.

5.3.2.2.3. Vergleich der beiden Versuche

Bei der Kinetik der an Albumin gebundenen Aktivität fällt zunächst der geringere Bindungsanteil bei Hund II auf. Der Unterschied wird besonders deutlich, wenn man statt der absolut gebundenen Menge von ^3H -9a-F (siehe Abb.12) den relativen Anteil an der Gesamtaktivität (siehe Abb.13) betrachtet. Dafür bieten sich drei Erklärungsmöglichkeiten an: Erstens, die Bindungsstellen am Protein sind bereits von (einer) anderen Substanz(en), z.B. im Operationsstreß vom Hund ausgeschütteten Corticosteroiden besetzt. Eine solche Erklärung ist zwar für ein hochspezifisches, mit niedriger Kapazität gekennzeichnetes Bindungsprotein, z.B. CBG, annehmbar, nicht jedoch für Albumin, das sich gerade durch seine hohe Kapazität bei niedriger Spezifität auszeichnet.

Zweitens, ein weiteres Protein konkurriert mit Albumin um das zu bindende Steroid und bindet aufgrund seiner höheren Bindungsaffinität die Hauptmenge des Steroids an sich. Tatsächlich fanden wir bei diesem Versuch (II) eine maximale Bindung an AAG von 55% der Gesamtaktivität im Plasma, gegenüber einer maximalen Albuminbindung von nur 7%.

Drittens, das Steroid wird zwar zunächst von beiden Pro-

teinen gebunden, aber die Affinität für 9a-F bzw. seine Metaboliten an AAG ist bei Hund II möglicherweise individuell bedingt höher als bei Hund I (siehe Abschnitt 5.3.2.3.). Das relativ locker an Albumin gebundene 9a-F ist den Eliminationsvorgängen (Metabolisierung und Ausscheidung) leichter zugänglich und verschwindet somit aus der Bindung.

5.3.2.3. Kinetik der Bindung an AAG

5.3.2.3.1. Versuch I

Der gebundene Anteil erhöhte sich zunächst von 32500 dpm/ml (10 min. p.a.) auf 39200 dpm/ml (45 min. p.a.). Anschließend fällt er nahezu kontinuierlich mit einer Halbwertszeit von 75 min. bis auf 2370 dpm/ml bei 360 min. p.a.

Der relative Anteil steigt ebenfalls zunächst von 15,8 (10 min. p.a.) auf 43,5% (60 min. p.a.) und verringert sich bis auf 15,2% (360 min. p.a.).

5.3.2.3.2. Versuch II

Hier zeigt sich zunächst ein steiler Anstieg der Aktivität von 5600 dpm/ml (2 min. p.a.) auf 80000 dpm/ml (30 min. p.a.), der dann etwas flacher wird und bei 60 min. das Maximum von 94500 dpm/ml erreicht. Bis zur 240 min. p.a. fällt die Aktivität auf 35600 dpm/ml. Der relative Anteil erhöht sich von 2% bei 2 min. auf 39,4% (30 min.) und 46,3% (60 min. p.a.) bis zum Maximum von 55,4% (180 min. p.a.) und fällt schließlich auf 52,7% (240 min. p.a.).

5.3.2.3.3. Vergleich der beiden Versuche:

Während wir also bei der Albuminbindung in den zwei Versuchen sehr unterschiedliche Verläufe fanden, zeigte die Bindung an AAG eine größere Übereinstimmung (siehe Abb. 15 , 16). Beide Versuche zeigen dabei zwei Phasen. In der ersten Phase erfolgt ein Anstieg des gebundenen Anteils, wobei nach ca. 60 min. das Maximum erreicht wird. In der daran anschließenden Phase sinkt der ge-

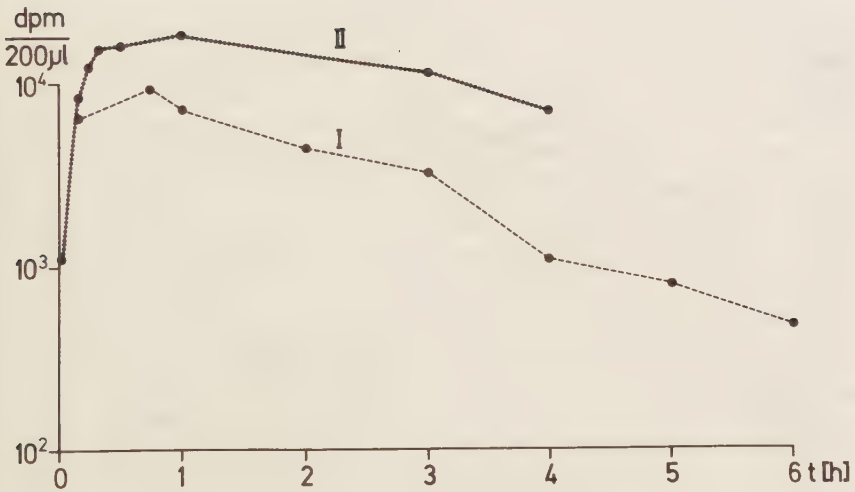


Abb.15: Verlauf der an α_1 -saures Glykoprotein (AAG) gebundenen Radioaktivitätsmenge in Abhängigkeit von der Zeit bei Versuch I und II. Auftrennung der Plasmaproteine durch isoelektrische Fokussierung.

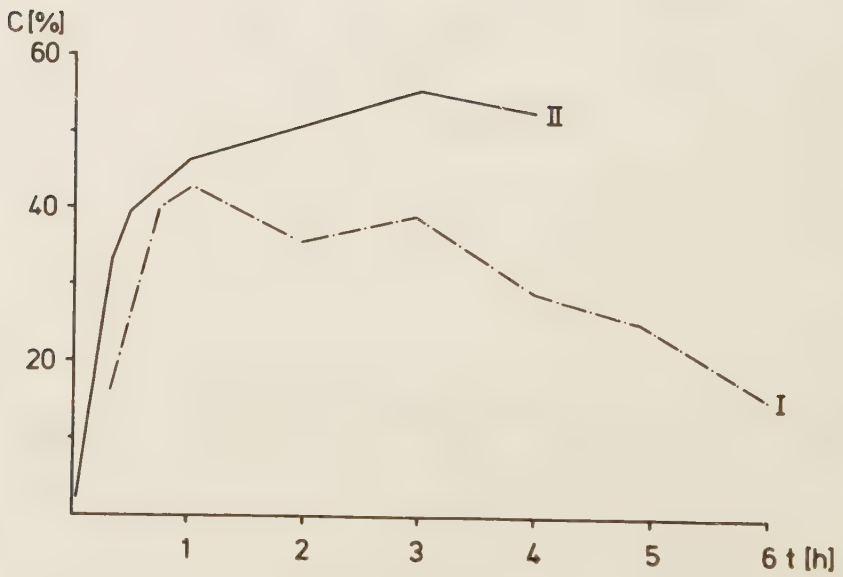


Abb.16: Relativer Anteil der an AAG gebundenen Radioaktivität in Prozent der Gesamtaktivität bei Versuch I. und II.

bundene Anteil kontinuierlich ab.

Das schnellere Absinken des gebundenen Anteils bei Versuch I läßt sich dadurch erklären, daß diesem Hund die entnommene Galle nicht mehr reinfundiert wurde. Die somit bewirkte schnellere Elimination führt sekundär zu einer Verschiebung des Bindungsgleichgewichts.

5.3.2.4. Gesamtvergleich der Kinetik der Proteinbindung

Die aus den beiden Tierversuchen gewonnenen Plasmaproben zeigten zum Teil durch die Versuchsmethodik, andernteils möglicherweise individuell bedingte, charakteristische Unterschiede. Wie bereits ausgeführt (siehe Abschnitt 4.2.3.2.), wurde dem Hund in Versuch II der größte Teil der entnommenen Gallenflüssigkeit ins Duodenum reinfundiert. Bei Hund I war der enterohepatische Kreislauf ausgeschaltet. Die dadurch bedingte schnellere Elimination zeigt sich in einem rascheren Abfall der gemessenen Gesamtaktivität (Abb.17).

Die Kinetik der Proteinbindung von 9a-F verläuft nach unseren Untersuchungen in zwei Phasen. Die erste Phase nach i.v. Applikation des markierten Steroids dauert dabei etwa 45 - 60 Minuten. Diese Zeitspanne dient wahrscheinlich der Einstellung des Bindungsgleichgewichtes zwischen freiem, im Blutplasma gelösten Steroid, seinen schnell entstehenden Metaboliten und ihrem eiweißgebundenem Anteil. Die Zunahme der Eiweißbindung verläuft linear bis ein gebundener Anteil von 40% der Gesamtaktivität im Blutplasma erreicht ist; dies dauert bei Versuch I 45 min. und bei Versuch II 30 min. . In der sich anschließenden zweiten Phase, sinkt der Aktivitätsanteil von AAG kontinuierlich ab; der an Albumin gebundene Aktivitätsanteil fällt ebenfalls zunächst ab, beginnt aber bei Versuch I nach 3 Stunden p.a. wieder stetig anzusteigen.

Um auszuschließen, daß die Umverteilungsvorgänge zwischen Albumin und AAG auch in vitro entstehen können, trennten wir mit ^3H -9a-F verschieden lange inkubierte Hundeseren in der angegebenen Weise durch isoelektrische Fokussierung auf. Dabei zeigten alle Seren bei

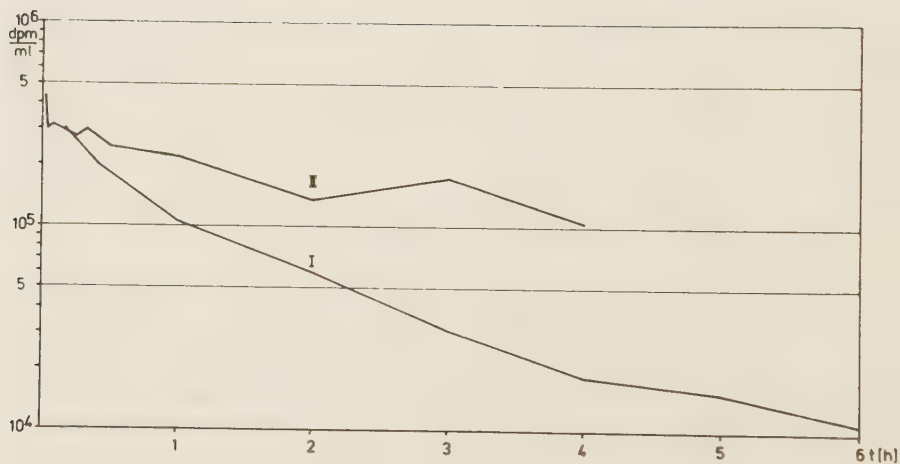


Abb.17: Summenaktivität in den durch isoelektrische Fokussierung aufgetrennten Eiweißfraktionen. Vergleich des zeitlichen Verlaufs bei Versuch I und II. Der schnellere Abfall der Summenaktivität bei Versuch I ist durch Ausschaltung des enterohepatischen Kreislaufs bedingt.

Inkubationszeiten von 2 bis 120min. die gleiche Radioaktivitätsverteilung. Umverteilungsvorgänge, wie wir sie in vivo fanden, traten in vitro nicht auf. Eine Metabolisierung findet in vitro nicht statt (19). Demnach ist die beobachtete Umverteilung nur durch die in vivo ablaufende Metabolisierung erklärbar.

5.4. VERGLEICH DES ZEITLICHEN VERLAUFS DER PROTEINBINDUNG MIT DER METABOLISIERUNGSKINETIK VON ^3H -9a-F

5.4.1. Beschreibung der Metabolisierungskinetik

Zur Überprüfung der Annahme, daß die oben genannten Umverteilungsvorgänge bei der Eiweißbindung eine Folge der Metabolisierung von ^3H -9a-F sind, untersuchten wir anhand der Dünnschichtchromatographie die Metabolisierungskinetik von ^3H -9a-F.

Durch Zugabe von unmarkiertem 9a-F zu den Plasmaproben konnte nach der chromatographischen Trennung die Substanz durch Fluoreszenzlöschung leicht lokalisiert und gemessen werden. Die entstandenen Metaboliten blieben dabei entweder an der Auftragsstelle liegen oder wanderten in diesem Fließmittelsystem weniger weit. Ihre chemische Natur dürfte vermutlich den von SCHRIEFERS (54) in der Rattenleber bestimmten Stoffwechselprodukten des 9a-F entsprechen, die ausschließlich vom Pregnan-Typ sind. 9a-Fluor-5 β -pregnan-triol-(11 β ,17 α ,21)-dion-(3,20) ist weniger polar als Fluorhydrocortison. Der daraus durch die 3 β -ol-Dehydrogenase gebildete Metabolit ist hingegen polarer als die Ausgangsverbindung.

Da die Bindung von Steroiden an Proteine der Polaritäts-Regel unterliegt (siehe Abschnitt 3.3.3.), vermindert sich die Bindungsaffinität mit steigender Polarität. Verschieden polare Metaboliten zeigen deshalb unterschiedliche Affinitäten, was sich in einer Änderung der Bindung an die Plasmaproteine auswirken kann.

Die graphische Darstellung des prozentualen Anteils von unverändertem ^3H -9a-F an der Gesamtaktivität im Plasma,

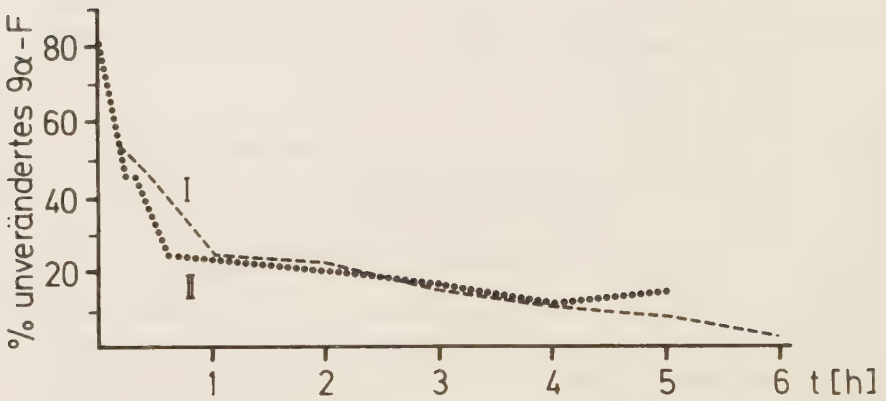


Abb.18: Anteil des nicht-metabolisierten, unveränderten ^3H -9 α -Fluorhydrocortisons in Prozent der Gesamtaktivität.

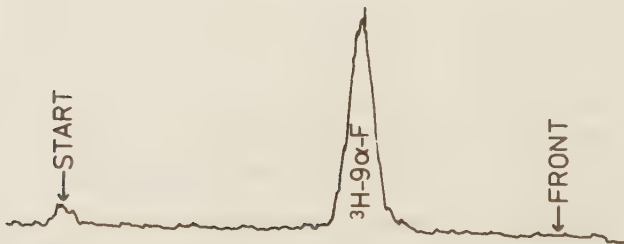


Abb.19: Darstellung des dünnschicht-chromatographisch aufgetrennten, nicht-metabolisierten ^3H -9 α -Fluorhydrocortisons im Radiochromatogrammscanner.

Fließmittelsystem: Chloroform : Methanol = 7 : 3 .

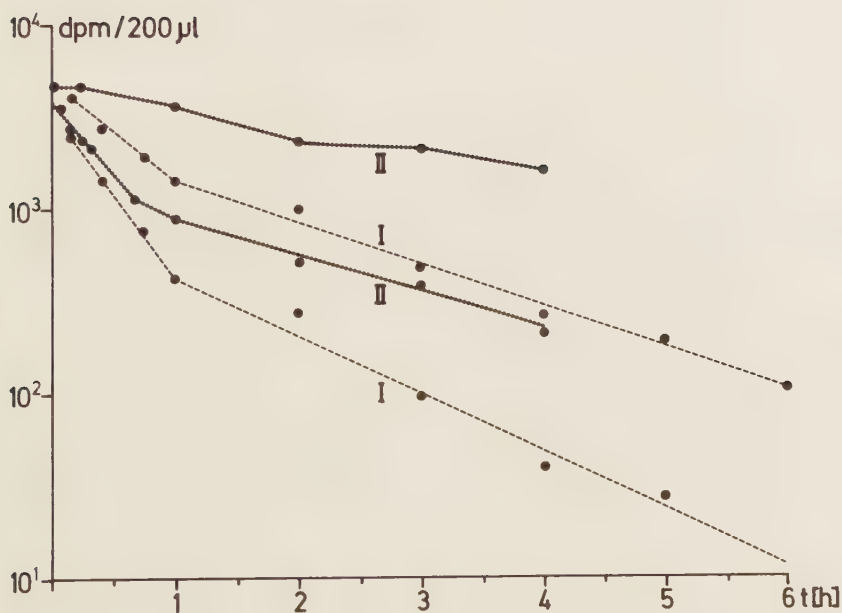


Abb.20: Verlauf der Gesamtaktivität im Plasma (obere Kurven) verglichen mit dem Verlauf des nicht-metabolisierten ^3H -9aF bei Versuch I und II (untere Kurven).

in Abhängigkeit von der Zeit zeigt bei beiden Versuchen einen deutlichen Knick in der Verlaufskurve (Abb. 18, Tabelle 7). Bei Versuch I liegt er etwa bei 60 min. p.a. und in Versuch II bei 45 min. p.a. . Ausgehend von ca. 80% unveränderter Substanz im Plasma (II) nach 1 min., fällt dieser Anteil zunächst steil mit einer Halbwertszeit ($t_{1/2}$) von 23 min. auf einen Wert von 24% nach 40 min. und sinkt danach langsam ($t_{1/2} = 87$ min.) auf etwa 11% nach 4 Stunden. Bei Versuch I erfolgt der steile Abfall mit einer Halbwertszeit von 20 min., der langsamere Teil hat im Vergleich zu II eine kürzere Halbwertszeit von 58 min.

SCHRIEFERS und KORUS fanden bei der Perfusion eine ähnliche Kinetik des Stoffwechsels von 9a-F-acetat. Die Tatsache, daß sich die Umsatzgeschwindigkeit innerhalb der ersten Minuten von einem hohen Ausgangswert auf einen kleineren, konstanten Endwert einstellt, läßt sich folgendermaßen erklären: Zunächst gelangt das Substrat sehr schnell an alle steroid-stoffwechsel-aktiven Zentren der Zelle, es kommt fast augenblicklich zu einer Substratsättigung der beteiligten Enzyme und damit auch sofort zur Entfaltung der maximalen Reaktionsgeschwindigkeit. Die Reaktionsgeschwindigkeit geht aber dann in dem Maße zurück, wie sich die Reaktionsprodukte anhäufen (55).

Nach BRIGGS ist der anfängliche rasche Abfall im Serum durch die Gleichgewichtseinstellung zwischen den einzelnen Kompartimenten und der danach folgende langsame Abfall durch die geschwindigkeitsbestimmende Elimination zu erklären (9).

Beim Vergleich der dünnschichtchromatographisch ermittelten Verlaufskurve mit dem Verlauf der bei der isoelektrischen Fokussierung gefundenen freien, nicht eiweißgebundenen Radioaktivitätskonzentration (Abb. 21, 22) ergibt sich folgendes: dem anfänglich steilen Abfall der freien Aktivität im Plasma (bei spiegelbildlich dazu erfolgendem Anstieg der Eiweißbindung) entspricht die

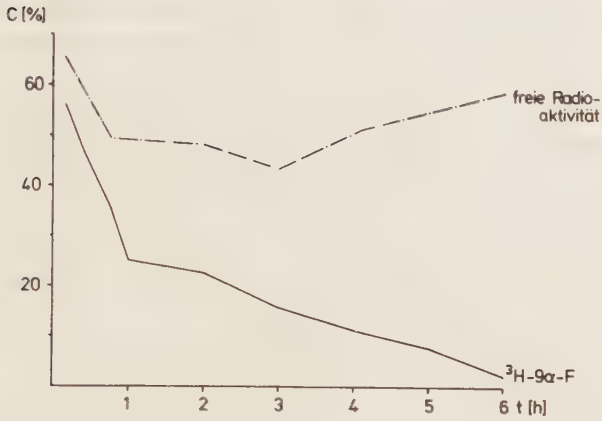


Abb.21: Vergleich der relativen Konzentrationen von unverändertem ^3H -9 αF und der nicht-proteingebundenen Radioaktivität bei Versuch I.

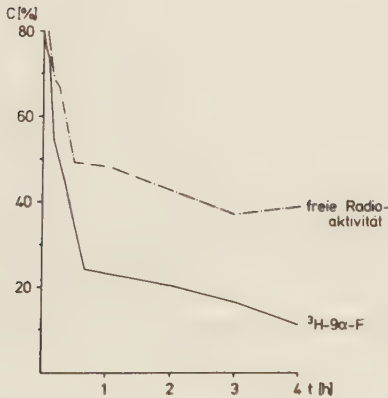


Abb.22: Vergleich der relativen Konzentrationen von unverändertem ^3H -9 αF und der nicht-proteingebundenen Radioaktivität bei Versuch II.

Abnahme von unverändertem ^3H -9a-F im Plasma ($t_{1/2} = 20$ min.), so daß in beiden Versuchen nach 60 Minuten nur noch 50% der freien Radioaktivitätskonzentration unverändertes ^3H -9a-F sind. Bis zur 180. Minute p.a. ändert sich an dieser Verteilung nichts, danach jedoch nimmt bei fortdauernder Verringerung des unveränderten ^3H -9a-F der relative freie Anteil stetig zu (die absolute Menge bleibt nahezu gleich), wie dies bei Versuch I klar zum Ausdruck kommt. Bei Versuch II standen uns leider nur Plasmaproben bis 4 Stunden p.a. zur Verfügung, somit kommt darin dieser Anstieg nach 180 min. p.a. nur angedeutet zum Ausdruck.

Bildet man nun die Differenz aus der freien, nicht-eiweißgebundenen Radioaktivitätskonzentration im Plasma und der noch unveränderten ^3H -9a-F Menge, so erhält man einen Hinweis auf die Konzentration der freien Metaboliten im Plasma. Der zeitliche Verlauf dieser Konzentration zeigt nach unseren Messungen 3 Phasen. In der ersten Phase, die bei Versuch I bis zur 60.min. und bei Versuch II bis zur 40.min. dauert, erfolgt eine rasche Zunahme der Metaboliten, bis ein Anteil der freien Metaboliten von etwa 25% an der Gesamtaktivität im Plasma erreicht ist. Daran schließt sich eine Plateauphase an, die bei beiden Versuchen bis zur 180.min. anhält. Die letzte Phase bringt schließlich einen nochmaligen stetigen Anstieg der freien Metabolitenkonzentration im Plasma, bis nach 6 Stunden etwa 60% der Gesamtaktivität im Plasma als freie, nicht-eiweißgebundene Metaboliten vorliegen. In dieser Phase überwiegt offensichtlich immer stärker die Bildung wasserlöslicher Stoffwechselprodukte, die als stark polare Konjugate ausgeschieden und im Urin nachgewiesen werden können (70).

5.4.2. Der zeitliche Verlauf der Albuminbindung im Vergleich zur Metabolisierung

Wie bei dem vorhin dargestellten Verlauf der unveränderten Menge an ^3H -9a-F und dem freien, nicht-gebundenen Anteil findet sich auch bei der Bindung an Albumin ein zunächst steiler Abfall bis zur 60. Minute mit einer Halbwertszeit von 18 min. (I) bzw. 27 min. (II) und ein flacher Abfall bis zur 240. Minute ($t_{1/2} = 150$ min. (I, II)).

Bei Versuch I zeigt sich bis zur 360. min. noch ein Anstieg der absoluten Menge, der bei II aus den oben genannten Gründen (5.3.2.2.2.) nicht zur Darstellung kommt.

Während der erste Teil dieses Verlaufs der Albuminbindung mit dem initialen Abfall des unveränderten ^3H -9a-F völlig parallel geht, weichen die folgenden Phasen zunehmend stärker ab und sind dann am besten mit dem Verlauf der entstandenen Metaboliten zu vergleichen. Dies kommt wiederum in Versuch I bedingt durch den längeren Beobachtungszeitraum stärker zum Ausdruck.

Aus dem dargestellten Verlauf kann man annehmen, daß die an Albumin gebundene Substanz zunächst hauptsächlich unverändertes ^3H -9a-F ist. Durch die fortlaufende Verringerung von ^3H -9a-F bei gleichzeitiger Zunahme von Metaboliten kommt es dann zu einer Umverteilung. Schließlich steigt sogar die absolut gebundene Menge, was, entsprechend der Polaritätsregel, möglicherweise auf die Bindung von Metaboliten geringerer Polarität schließen läßt.

5.4.3. Der zeitliche Verlauf der Bindung an AAG im Vergleich zur Metabolisierung:

Wie bereits oben angeführt (5.3.2.3.2.) zeigt die Kinetik der Bindung von ^3H -9a-F und seiner Metaboliten an AAG im wesentlichen einen zweiphasigen Verlauf bei beiden Versuchen.

Auf einen steilen Anstieg folgt ein langsamer Übergang in ein stetiges Absinken. Bei Versuch II erfolgt der

Anstieg steiler, der Abfall ist jedoch mit einer Halbwertszeit von 140 min. wesentlich flacher als in I ($t_{1/2} = 75$ min.). Diese langsamere Abnahme ist durch die in diesem Versuch (II) durchgeführte Rückführung der entnommenen Galle (s. Abschn. 4.2.5.) bedingt. Daraus ist zu folgern, daß ein großer Teil der an AAG gebundenen Substanz Metaboliten sein müssen. Ein Vergleich der Verläufe von AAG, unveränderten ^3H -9 α -F und seinen Metaboliten zeigt, daß bis zur 240. min. die an AAG gebundene Radioaktivität und die Summe der Metaboliten parallel verlaufen. Bei Versuch I gleicht sich von der 240. min. bis zur 360. min. der Verlauf von AAG dem des unveränderten ^3H -9 α -F an, während, wie vorhin gezeigt, die Kurve der Metaboliten in dieser Phase dem Albuminverlauf nahekommt. Diese Verläufe lassen sich nur aus einer Umverteilung von ^3H -9 α -F und seinen Metaboliten zwischen den bindenden Plasmaproteinen erklären. Nach der Polaritätsregel könnte sich eine Umverteilung z.B. durch die Bildung von Metaboliten mit unterschiedlicher Polarität ergeben. Aus der Reihe der oben angegebenen (5.4.1.) von SCHRIEFERS (54) beschriebenen Metaboliten des 9 α -F käme möglicherweise für eine Bindung an AAG die im Vergleich zu 9 α -F weniger polare Substanz 9 α -Fluor-5 β -pregnan-triol-(11 β ,17 α ,21)-dion-(3,20) in Frage, wenn auch die für die Eiweißbindung wichtigen Eigenschaften der Δ^4 -3-Ketogruppierung im Ring A verändert sind.

Eine sichere Klärung der Frage, welche Metaboliten in einer bestimmten Phase an die beschriebenen Proteine gebunden sind, hätte nicht nur den Umfang dieser Arbeit gesprengt, sondern ist bei den vorhandenen außerordentlich niedrigen Konzentrationen an Substanz (etwa 0,3 $\mu\text{g/ml}$ Plasma bei Versuch I und 0,6 $\mu\text{g/ml}$ bei Versuch II) beim augenblicklichen Stand der Technik nicht möglich. Eine Beziehung zwischen der Kinetik der Bindung von Steroiden an einzelne Plasmaproteine und dem Metabolisierungsprozeß konnte deshalb nur durch den Vergleich der gefundenen Verläufe der eiweißgebundenen Aktivität und der Abnahme unveränderten Steroids herge-

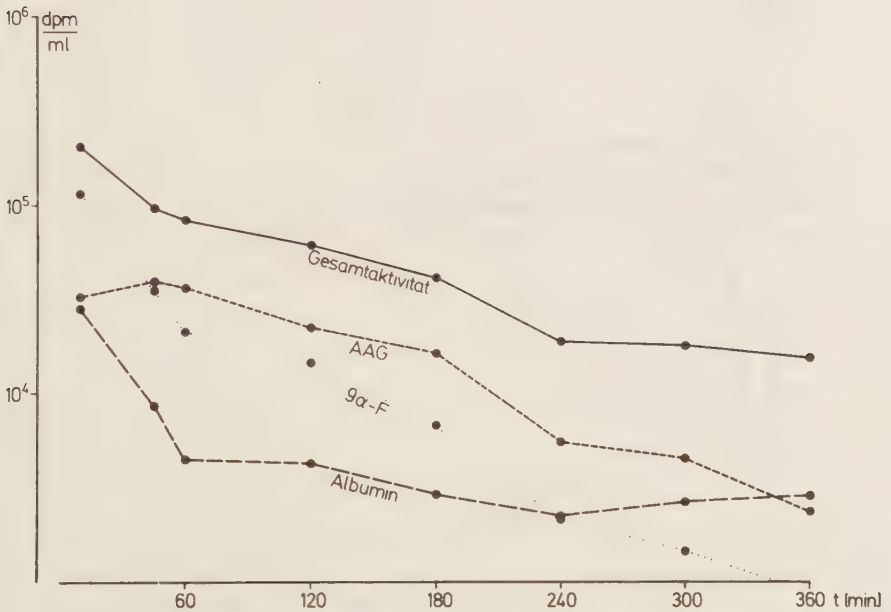


Abb.23: Zusammenschau des zeitlichen Verlaufs der Gesamtaktivität im Nativplasma, des nicht-metabolisierten ^3H -9αF, sowie der an Albumin und AAG gebundenen Radioaktivität bei Versuch I.

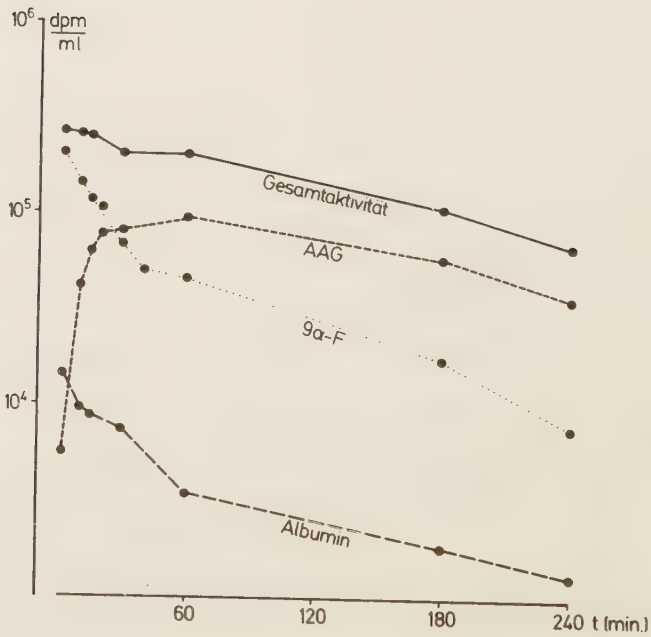


Abb.24: Zusammenschau des zeitlichen Verlaufs der Gesamtaktivität im Nativplasma, des nicht-metabolisierten ^3H -9aF, sowie der an Albumin und AAG gebundenen Radioaktivität bei Versuch II.

stellt werden.(s. Abb. 23,24).

Es war nicht möglich, bei diesen Versuchen pharmakokinetische Kenngrößen für die Bewegungen in den einzelnen Plasmaprotein-Kompartimenten zu bestimmen. Dazu wären größere Versuchsreihen nötig, um die von nur 2 Versuchstieren vorliegenden Ergebnisse zu stützen.

Die von unserer Arbeitsgruppe erstmals gemachte Beobachtung, daß die Bindung eines Steroids an bestimmte Plasmaproteine, in Abhängigkeit von der Zeit, Veränderungen unterworfen ist, die sich dem Metabolisierungsprozeß zuordnen lassen, konnte jedoch mit leistungsfähigen, teilweise neuartigen Methoden der Proteintrennung bestätigt werden. Welchen Einfluß diese Tatsache auf die Bioverfügbarkeit eines Steroidpharmakons besitzt, kann zu diesem Zeitpunkt nicht endgültig abgeschätzt werden und bleibt Gegenstand weiterer Untersuchungen.

6.

Z U S A M M E N F A S S U N G:

Die Plasmaproteinbindung eines Steroids (am Beispiel des Mineralocorticoids 9α -Fluorhydrocortison) wurde beim Hund mit Hilfe der Disk-Elektrophorese und der isoelektrischen Fokussierung in Abhängigkeit von der Zeit nach der Applikation und damit der Metabolisierung untersucht.

Beim Vergleich dieser Proteintrennmethoden erwies sich die Modifikation der isoelektrischen Fokussierung im Dünnschichtgel als für diese Fragestellung besonders geeignet. Sie allein genügte den Anforderungen, die sich erstens aus den Gegebenheiten des Tierversuchs (die geeignete Methode durfte nur ein geringes Probenvolumen erfordern, da nur wenig Material zur Verfügung stand) und zweitens aus allgemeinen Forderungen hinsichtlich rationeller Durchführung, hoher und reproduzierbarer Auftrennung der Plasmaproteine sowie einer geringst-möglichen Beeinflussung des Steroid-Protein Bindungsgleichgewichts ergaben.

Mit dieser Methodik konnte eine Bindung von 9α -F an α_1 -saures Glykoprotein (AAG) und Albumin aufgezeigt werden, wobei die Kinetik der Eiweißbindung, wegen der unterschiedlichen Bindungseigenschaften dieser Proteine, charakteristische Unterschiede aufwies. In beiden Fällen lassen sich im wesentlichen zwei Phasen abgrenzen: eine 1.Phase innerhalb von 60 Minuten nach Applikation des Präparates und eine 2.Phase in der Folgezeit. Diese Kinetik der Eiweißbindung steht im Einklang mit der durch Dünnschichtchromatographie ermittelten Metabolisierungskinetik. Dabei zeigt sich ein ähnlicher phasenhafter Verlauf mit einer raschen Abnahme der Konzentration an unverändertem Steroid in der 1.Stunde p.a., die danach deutlich langsamer absinkt.

Der an AAG gebundene, relative sowie auch absolute Anteil des radioaktiv-markierten Steroids nimmt in der 1.Phase steil zu und fällt dann parallel zur Abnahme des unveränderten, nicht-metabolisierten 9α -F im Plasma

kontinuierlich ab. Daneben bindet AAG auch Stoffwechselprodukte von 9a-F, die wahrscheinlich den durch 5 β -Reduktase gebildeten, weniger polaren Metaboliten entsprechen.

Die an Albumin gebundene, absolute Menge von 9a-F nimmt in der 1.Phase parallel zur Verringerung des nicht-metabolisierten 9a-F ab, In der 2.Phase nimmt die an Albumin gebundene Menge nur mehr geringfügig ab und nimmt nach 3 Stunden p.a. sogar zu. Dieser Anstieg der Albuminbindung erklärt sich mit der Zunahme polarer Metaboliten.

Die hier beim Hund aufgezeigte Kinetik der Bindung von 9a-F an Albumin bestätigt die präliminären Ergebnisse, die bei einem Probanden mit der nur begrenzt leistungsfähigen Kartonelektrophorese erzielt wurden.

Die beschriebene Methode erlaubt darüberhinaus eine weitergehende Auftrennung und eine genaue Zuordnung der Plasmaproteine durch ihren jeweiligen isoelektrischen Punkt.

7.

TABELLARISCHER ANHANG

Versuch I		Versuch II	
Zeit min.	Radioaktivität dpm/ml	Zeit min.	Radioaktivität dpm/ml
10	299.300	1	434.200
25	199.100	2	295.000
45	138.100	5	303.300
60	102.500	10	286.700
120	59.900	15	270.700
180	31.200	20	294.400
240	18.600	30	243.500
300	15.500	60	220.900
360	11.100	120	136.600
		180	176.000
		240	105.700

Tabelle 1: Gesamtaktivität im Plasma zu verschiedenen Zeiten nach intravenöser Gabe von ^3H -9aF. Es wurden jeweils 10 μl Plasma entnommen und mit 20 ml Szintidioxan vermischt.

Versuch I								
Zeit								
min.	10	45	60	120	180	240	300	360
1	15385	34600	28750	15050	15415	3245	2925	1745
2	17120	7550	7640	7095	1215	2245	1565	625
3	990	720	740	3285	1275	1705	625	485
4	1370	466	795	2295	1445	855	660	705
5	5845	1275	815	1055	790	585	1010	665
6	10860	3150	1205	1895	925	745	1015	1325
7	11465	4287	2390	1320	1200	880	630	870
8	7805	17746	9490	2460	1540	1195	865	1285
9	48085	22675	25245	18430	1825	4295	4380	2550
10	65115	4092	3380	4645	9920	935	1180	925
11	16040	554	540	670	1840	435	415	475
12	1195	300	330	455	685	430	435	495
13	550	333	245	345	610	300	375	415
14	485	404	310	460	565	285	375	450
15	440	312	250	350	405	320	285	385
16	345	279	330	385	430	365	345	405
17	450	725	225	430	440	275	425	590
18	420	417	260	575	375	255	425	440
19	450	350	275	485	700	255	470	440
20	815	325	300	400	580	280	340	290

Tabelle 2: Isoelektrische Fokussierung.

Radicaktivitätsverteilung in 20 Gelfraktionen bei
8 Plasmaproben aus definierten Entnahmezeiten nach
intravenöser Gabe von ^3H -9aF bei Versuch I.

Angaben in dpm/ml . Probenauftrag pro Gelplatte 200µl

Versuch II								
Zeit								
min.	2	10	15	20	30	60	180	240
1	4415	27130	48125	43930	64775	71710	47410	33600
2	1175	12450	13350	33720	15255	22590	10230	2105
3	7195	1395	2445	895	1740	865	530	460
4	9540	1395	3245	1275	4175	895	550	395
5	6380	3090	2930	1070	2265	985	550	485
6	3700	4245	3720	1080	3130	1325	740	295
7	4285	2280	2090	1525	2000	1155	575	525
8	3600	2235	2115	1150	1160	1505	690	455
9	22110	6260	16270	8875	7520	12750	2905	1855
10	177335	148645	143795	115185	74535	76975	28635	19080
11	23780	23865	9480	19640	18330	7375	7055	5410
12	915	10045	835	1210	1565	780	1125	590
13	450	1990	580	440	730	585	485	420
14	875	3335	465	280	475	485	370	295
15	535	675	1085	335	430	435	375	300
16	450	475	640	380	1330	400	330	280
17	530	555	475	385	2035	665	340	275
18	455	1030	605	390	405	470	370	325
19	410	765	525	410	570	860	335	285
20	565	1260	1540	365	625	640	360	245

Tabelle 3: Isoelektrische Fokussierung.

Radioaktivitätsverteilung in 20 Gelfraktionen bei
 8 Plasmaproben aus definierten Entnahmezeiten nach
 intravenöser Gabe von ^3H -9aF bei Versuch II.
 Angaben in dpm/ml. Probenauftrag pro Gelplatte 200µl.

Versuch I									
Zeit									
min.	10	25	45	60	120	180	240	300	360
1	12322	6011	8555	7155	4378	2033	744	700	733
2	6167	6622	7178	8811	4222	2533	800	1678	622
3	6833	7044	11556	9222	7167	4211	1211	1022	822
4	3833	3511	3711	2722	4544	1367	744	733	700
5	1722	1455	933	722	1144	589	467	400	422
6	1244	1055	633	533	600	511	367	333	478
7	1055	911	600	489	522	467	378	367	344
8	1222	744	611	489	555	422	300	389	389
9	1500	955	600	500	578	489	411	422	367
10	1922	1100	689	433	722	589	467	400	389
11	2278	1389	644	533	600	622	433	411	411
12	1711	1178	655	578	578	600	411	433	389
13	1455	1133	644	511	611	411	344	455	455
14	1389	1022	611	522	489	433	322	422	422
15	1544	1022	567	411	544	478	333	289	355
16	1467	1022	533	522	522	589	367	344	422
17	1333	1011	700	333	544	411	355	400	444
18	1233	767	600	355	478	489	378	400	378
19	1211	844	589	489	522	411	644	389	367
20	1544	933	478	533	578	489	400	467	367
SG	4000	2355	2233	1567	911	622	744	411	400

Tabelle 4: Disk-Elektrophorese.

Radioaktivitätsverteilung in 20 Fraktionen des Trenngels und im Sammelgel (SG) bei 9 Plasma-
proben aus definierten Entnahmezeiten nach
intravenöser Gabe von ^3H -9aF bei Versuch I.
Angaben in dpm/ml. Probenauftrag 90 μl in 9
Gelzylindern.

Versuch II									
Zeit									
min.	5	10	15	20	30	60	120	180	240
1	5100	7733	7878	14555	14689	13855	9222	6489	4167
2	4022	10978	20878	26244	21478	35778	19411	15144	11767
3	7633	21811	13022	27944	37500	22644	25578	24800	12720
4	4255	7611	1800	6622	12189	4122	6222	5200	3567
5	989	1133	978	1444	1867	2111	1111	967	1110
6	744	678	800	922	1155	1055	711	900	1044
7	689	711	689	822	789	733	678	844	767
8	733	722	667	778	844	722	544	567	755
9	889	867	689	867	889	1067	611	711	620
10	1178	989	733	900	2044	1189	455	889	544
11	1089	767	644	778	755	1233	600	967	620
12	778	655	689	633	1278	555	555	767	500
13	778	755	611	667	1678	1455	500	633	489
14	811	722	689	655	900	1033	478	622	378
15	878	611	633	722	1233	1367	478	711	444
16	878	711	600	611	1155	578	411	722	433
17	811	678	500	589	1022	1144	378	622	467
18	833	711	611	567	633	611	378	733	378
19	989	655	589	667	844	544	445	611	422
20	1067	778	711	700	1033	622	500	700	389
SG	2122	5311	1944	2000	2267	1955	856	933	811

Tabelle 5: Disk-Elektrophorese.

Radioaktivitätsverteilung in 20 Fraktionen des Trenngels und im Sammelgel (SG) bei 9 Plasma-
proben aus definierten Entnahmezeiten nach
intravenöser Gabe von ^3H -9aF bei Versuch II.
Angaben in dpm/ml. Probenauftrag 90 μl in 9
Gelzylindern.

Versuch I				
Zeit min.	AAG %	Albumin %	Auftragstelle %	Restgel %
10	15,8	13,7	62,9	7,6
45	40,1	8,9	45,6	5,4
60	43,5	5,3	45,6	5,6
120	35,6	6,8	41,2	16,4
180	39,4	6,9	32,2	21,5
240	29,1	11,6	33,9	25,3
300	24,8	14,7	35,5	25,0
360	15,2	18,4	30,5	35,9
Versuch II				
2	2,0	5,4	83,0	9,6
10	16,0	3,7	68,7	11,6
15	24,5	4,0	67,6	3,9
20	33,4	1,7	61,8	3,1
30	39,4	3,6	49,4	7,6
60	46,3	1,7	47,7	4,3
180	55,4	1,7	37,1	5,8
240	52,7	1,9	38,9	6,5

Tabelle 6: Isoelektrische Fokussierung.

Relativer Anteil der an AAG und Albumin gebundenen Radioaktivität, sowie der an der Auftragstelle verbliebenen Radioaktivität. Angaben in Prozent der im Gel gemessenen Gesamtaktivität.

Zeit	Gesamtaktivität	unveränderte Substanz	
min.	dpm/ml	dpm/ml	%
Versuch I			
10	41.000	24.850	56,16
25	27.490	14.670	46,52
45	19.500	7.630	36,13
60	14.300	4.220	25,36
120	10.070	2.780	22,73
180	4.910	960	15,89
240	2.660	400	11,43
300	1.900	270	8,02
360	1.080	35	2,33
Versuch II			
1	42.640	37.250	79,63
2	47.460	41.390	76,54
5	44.390	35.180	73,23
10	45.200	27.410	54,50
15	46.440	23.940	45,80
20	45.090	21.660	45,77
40	40.410	11.440	24,09
60	36.520	9.090	23,13
120	23.630	5.110	20,48
180	21.950	3.900	16,67
240	16.520	2.100	11,34
300	19.090	2.950	14,16

Tabelle 7: Metabolisierungskinetik von ^3H -9aF.
Trennung der unveränderten Substanz im Plasma
von ihren Metaboliten durch Dünnschicht-
Chromatographie.

Versuch I								
Zeit min.	10	45	60	120	180	240	300	360
Gesamt- aktivität	205000	97600	83600	62100	42200	18900	18100	15600
AAG	32500	39200	36500	22150	16600	5500	4500	2370
Albumin	28150	8700	4400	4250	2900	2200	2650	2850
Summe aus AAG + Alb.	60600	47900	40900	26400	19500	7700	7150	5220
freie Aktivität	144400	49700	42700	35700	22700	11200	10950	10380
unveränder- tes 9aF	115000	35200	21200	14100	6710	2150	1450	360
Metaboliten	90000	62400	62400	48000	35500	16750	16650	15240

Tabelle 8: Verteilung der Radioaktivität in den durch isoelektrische Fokussierung getrennten Plasmaproteinfraktionen (AAG und Albumin) bei Versuch I. Vergleich mit dem durch Dünnschichtchromatographie ermittelten Anteil von unverändertem, nicht-metabolisierten ^3H -9aF im Plasma bezogen auf die Gesamtaktivität im Gel. Angaben in dpm/ml.

Versuch II							
Zeit							
min.	2	10	15	20	60	180	240
Gesamt- aktivität	268700	260000	251000	233000	203000	104000	67700
AAG	5600	41800	61500	77800	94500	57800	35600
Albumin	14400	9560	8750	7400	3450	1850	1300
Summe aus AAG + Alb.	20000	51400	70200	81500	97900	59600	36900
freie Aktivität	248000	208600	180800	151500	105100	44400	30800
unveränder- tes 9aF	205000	142000	113000	107000	46900	17400	7650
Metaboliten	63000	118000	138000	126000	156100	86600	60050

Tabelle 9: Verteilung der Radioaktivität in den durch isoelektrische Fokussierung getrennten Plasmaproteinfraktionen (AAG und Albumin) bei Versuch II. Vergleich mit dem durch Dünnschichtchromatographie ermittelten Anteil von unverändertem, nicht-metabolisierten ^3H -9aF im Plasma bezogen auf die Gesamtaktivität im Gel. Angaben in dpm/ml.

8. L I T E R A T U R :

- 1) ABRAHAM K., SCHÜTT K., MÜLLER I., HOFFMEISTER H.:
Kontinuierliche Polyacrylamid-Elektrophorese I :
Untersuchung an Normalseren.
Z. klin. Chem. klin. Biochem. 8 (1970) 92-98.
- 2) ALY F.W., BRAUN H., HADAM W.R., KALLEE E.:
Zur Bedeutung der Eiweißvehikelfunktion.
Arzneim.-Forsch. 18 (1968) 1467-1482.
- 3) BAIRD D.T., HORTON R., LONGCOPE C., TAIT J.F.:
Steroid dynamics under steady state conditions.
Rec. Progr. Hormone Res. 25 (1969) 611.
zit. in 74)
- 4) BATRA S.:
A new and improved method for the separation of
free from protein-bound progesterone.
J. Endocrinol. 62 (1974) 537-543.
- 5) BAULIEU E.-E.:
A 1972 survey of the mode of action of steroid hormones,
in: "Endocrinology", Ed. SCOW R.O.,
Proceedings of the fourth International Congress of
Endocrinology, Washington D.C., June 18-24, 1972,
American Elsevier Publishing Co., New York 1973,
pp 30-62.
- 6) BAULIEU E.-E., CORPEchot C., DRAY F., EMILIOZZI R.,
LEBEAU M.C., MAUVAIS-JARVAIS P., ROBEL P.:
An adrenal-secreted "androgen": Dehydroiso-andro-
sterone sulfate.
Rec. Progr. Hormone Res. 21 (1965) 411.
zit. in 74)

- 7) BAUMANN G., CHRAMBACH A.:
Lack of interaction between hormonal proteins and synthetic carrier ampholytes (Ampholine).
Analyt. Biochem. 64 (1975) 530-536.
- 8) BOYD J.B., MITCHELL H.K.:
Measurement of the radioactivity in carbon-14 and tritium-labeled proteins that have been separated by disk electrophoresis.
Analyt. Biochem. 14 (1966) 441-454.
- 9) BRIGGS M.H., BROTHERTON J.:
Steroid biochemistry and pharmacology.
Academic Press, London, New York, 1970.
- 10) BRUNELLI B.:
Sulla funzione veicolante delle proteine plasmatiche per l'ormone follicolare.
Archs. int. Pharmacodyn. Ther. 49 (1934) 262-271.
- 11) BURKE C.W.:
Accurate measurement of steroid-protein binding by steady-state gel filtration.
Bioch m. Biophys. Acta (Amst.) 176 (1969) 176
zit. in 74)
- 12) BUSH J.E.:
Physiochemical state of cortisol in blood.
Ciba Foundation Colloquia on Endocrinology, vol. 11, Hormones in Blood.
Edited by G.E.W. Wolstenholme, E.C.P. Miller;
Little, Brown and Co., Boston 1957, pp 263-285.
zit. in 49)
- 13) CATSIMPOOLAS N. (Editor) :
Isoelectric - Focusing.
Ann. N.Y. Acad. Sci. 209 (1973) 1-529.

- 14) DAUGHADAY W.H.:
Binding of corticosteroids by plasmaproteins.
IV. The electrophoretic demonstration of cortico-
steroid binding globulin.
J. Clin. Invest. 37 (1958) 519-523.
zit. in 49)
- 15) DAYTON P.G., ISRAILI Z.H., PEREL J.M.:
Influence of binding on drug metabolism and distri-
bution.
Ann. N.Y. Acad. Sci. 226 (1973) 172-194.
- 16) DE MOOR P., STEENO O., HEYNS W.:
Possible role or significance of protein-steroid
binding in plasma.
Ann. Endocr. (Paris) 29 (1968) 119-122.
- 17) DOST F.H.:
Grundlagen der Pharmakokinetik.
G. Thieme, Stuttgart 1968.
- 18) FELL P.J.:
Kinetic studies of cortisol and synthetic corti-
costeroids in man.
Clin. Endocrin. 1 (1972) 65-72.
- 19) GARBE A., WENZL H.:
Zur Kinetik der Metabolisierung des 9 α -Fluorhydro-
cortison.
Arzneim.-Forsch. 21 (1971) 1127-1132.
- 20) GILLETTE J.R.:
Overview of drug-protein binding.
Ann. N.Y. Acad. Sci. 226 (1973) 6-17.
- 21) GILLETTE J.R.:
Other aspects of pharmacokinetics;
in: Handbuch der experimentellen Pharmakologie Vol.28/
Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, New York 1975,
pp 35-40.

- 22) HAGLUND H.:
Isoelectric focusing in pH-gradients.
Methods of Biochemical Analysis 19;
LKB-Produkter AB, Stockholm.
- 23) HOFFMEISTER H.:
Elektrophorese in Gelen mit Molekularsiebeffekt.
in: "Serumproteine", hgg. A.Engelhardt, H.Lommel,
Band I, pp 41-49.
- 24) HORTON R., KATO T.:
Studies of testosterone-binding globulin.
3rd Int. Congr. Endocrinol. Mexico,
Excerpta Med. Found. Int. Congr. Ser. 157 (1968) 160.
zit. in 27)
- 25) KARLSSON C., DAVIES H., ÖHMANN J., ANDERSSON U.-B.:
I. Analytical thin layer gel electrofocusing in poly-
acrylamide gel.
LKB Application Note 75 (1973).
- 26) KEEN P.:
Effect of binding to plasma proteins on the distri-
bution, activity and elimination of drugs;
in: Handbuch der experimentellen Pharmakologie, Vol.28,
Teil 1, Kapitel 10, pp 213-233,
Eds. B.B. Brodie, J.R. Gillette,
Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, New York 1971.
- 27) KLEY H.K., KRÜSKEMPER H.L.:
Leber und Steroidhormone.
Med. Klin. 71 (1976) 799-805.
- 28) KLOTZ I.M.:
Physicochemical aspects of drug-protein interactions:
a general perspective.
Ann. N.Y. Acad. Sci. 226 (1973) 18-35.

- 29) KLOTZ I.M., URQUHART J.M.:
The binding of organic ions by proteins. Effect of temperature.
J. Amer. chem. Soc. 71 (1949) 847.
zit. in 74)
- 30) KOHLRAUSCH F.:
Ann. Physik u. Chemie 62 (1897) 209.
zit. in 37)
- 31) KRIEG M., WEICKER H.:
Die immunologische Identifizierung und Lokalisierung der Proteinfraktionen nach disk-elektrophoretischer Trennung auf Polyacrylamidgel.
Z. klin. Chem. u. klin. Biochem. 8 (1970) 293-298.
- 32) KRIEGLSTEIN J.:
Bestimmungsmethoden, physikochemische Grundlagen und pharmakokinetische Bedeutung der Plasmaproteinbindung von Arzneimitteln.
Arzneim.-Forsch. 23 (1973) 1527-1529.
- 33) KURZ H., FRIEMEL G.:
Artspezifische Unterschiede der Bindung an Plasmaproteine.
Naunyn-Schmiedeberg Arch. Pharm. Exp. Path. 257 (1967) 35-36.
- 34) LEBEAU M.-C., MERCIER - BODARD C., OLDS J., BOURQUIN D., BRECY T., RAYNAUD J.-P., BAULIEU E.E.:
Mesure de la liaison de la corticostérone, du sulfate de corticostérone, de la testostérone et de l'oestradiol à des protéines du plasma.
Ann. Endocr. (Paris) 30 (1969) 183-197.

- 35) LEBEAU M.-C., BAULIEU E.-E.:
Binding of steroid conjugates to human cortico-steroid binding globulin.
J. Clin. Endocr. 30 (1970) 166-173.
- 36) LEVEDAHL B.H., PERLMUTTER R.:
Testosterone binding to bovine serum albumin:
effect of pH.
Arch. Biochem. 61 (1956) 442.
zit. in 74)
- 37) MAURER H.R.:
Disc electrophoresis and related techniques of
polyacrylamide gel electrophoresis.
W. de Gruyter & Co., Berlin, New York 1971.
- 38) MEYER M.C., GUTMAN D.E.:
J. pharm. Sci. 57 (1968) 895.
zit. in 32)
- 39) MILGROM E., BAULIEU E.-E.:
Endocrinology 87 (1970) 276.
zit. in 5)
- 40) MULDOON T.G., WESTPHAL U.:
Steroid Protein Interactions: XV Isolation and
characterization of corticosteroid-binding glo-
bulin from human plasma.
J. Biol. Chem. 242 (1967) 5636-5643.
- 41) MURRAY D.:
Cortisol binding to plasma proteins in man in
health, stress and at death.
J. Endocr. 39 (1967) 571-591.
- 42) OERTEL G.W.:
Zur Bindung von sulfokonjugierten Steroiden an
Plasmaproteine.
Hoppe Seyler Z. Physiol. Chem. 341 (1965) 10-21.

- 43) OERTEL G.W., KNAPSTEIN P., HEIDE K.:
Distribution of C₁₉-steroid conjugates in plasma
protein fractions.
Experientia 25 (1969) 1192.
zit. in 74)
- 44) ORNSTEIN L.:
Disc Electrophoresis
Ann. N.Y. Acad. Sci. 121 (1964) 321-349.
- 45) RANEN H.M.:
Biochemisches Taschenbuch.
Springer Verlag, Berlin 1964.
- 46) RIGHETTI P.G., DRYSDALE J.W.:
Isoelectric focusing in gels.
J. Chromatography 98 (1974) 271-321.
- 47) RODBARD D., FELDMAN H.A.:
Theory of protein-ligand interaction.
Methods in Enzymology Vol.36, Hormone Action
Part A - Steroid Hormones
Academic Press, New York 1975.
- 48) ROSENTHAL H.E., SLAUNWHITE jr. W.R., SANDBERG A.A.:
Transcortin: a corticosteroid binding protein of
plasma.
X.: Cortisol and progesteron interplay and unbound
levels of these steroids in pregnancy.
J. clin. Endocr. 29 (1969) 352-367.
- 49) ROSNER W., SHERWOOD L.M., PARRIS E.:
Interaction of adrenal and gonadal steroids with
proteins in human plasma.
New England J. Med. 281 (1969) 658-665.

- 50) RYAN M.F., WESTPHAL U.:
Progesterone-binding affinity of isoelectric variants of human α_1 -acid glycoprotein.
J. Biolog. Chem. 247 (1972) 4050-4056.
- 51) SCATCHARD G.:
The attractions of proteins for small molecules and ions.
Ann. N.Y. Acad. Sci. 51 (1949) 660
- 52) SCHOLTAN W.:
Die Bindung der Sulfonamide an Eiweißkörper.
Arzneim.-Forsch. 15 (1965) 1433-1441.
- 53) SCHOLTAN W., SCHLOSSMANN K., ROSENKRANZ H.:
Die Bindung von Steroidhormonen und von Steroidguanylhydrazonen an Serumalbumin.
Arzneim.-Forsch. 18 (1968) 767-780.
- 54) SCHRIEFERS H.:
Stoffwechsel von 9α -Fluorhydrocortison in der Rattenleber.
Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 324 (1961) 188-195.
- 55) SCHRIEFERS H., KORUS W.:
Über die Kinetik des Stoffwechsels von Cortison, Prednison und 9α -Fluorhydrocortison bei der Rattenleberperfusion.
Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 318 (1960) 239-250.
- 56) SCHWARTZ U., HAMMERSTEIN J.:
A combined adsorption-gel filtration technique for the determination of the cortisol-binding capacity of transcortin.
Z. klin. Chem. klin. Biochem. 13 (1975) 291-297.
- 57) SCHWARZ K., HAIN H.:
Die therapeutische Anwendung von Mineralocorticoiden.
Schattauer Verlag, Stuttgart - New York 1973.

- 58) SCHWARZNFELD v. I.:
Plasmaeiweißbindung.
Die Pharmazie 29 (1974) 497-505.
- 59) SLAUNWHITE jr. W.R., SANDBERG A.A.:
Transcortin: a corticosteroid-binding protein of plasma.
J. clin. Invest. 38 (1959) 384-391.
- 60) SMITHIES O.:
Arch. Biochem. Biophys., Suppl.1 (1962) 125.
zit. in 37)
- 61) TAIT J.F., BURSTEIN S.:
In vivo studies of steroid dynamics in man.
in: The hormones, vol.V, chapter IV.
Eds.: G. Pincus, K.V. Thimann and E.B.Astwood.
Academic Press, New York, London 1964.
zit. in 74)
- 62) VAN BAELEN H., DE MOOR P.:
Steroid-protein interaction as studied by isoelectric focusing.
J. Steroid Biochem. 3 (1972) 321-323.
- 63) VAN BAELEN H., DE MOOR P.:
Binding of progesterone by the α_1 -acid glycoprotein.
Ann. Endocrin. (Paris) 31 (1970) 829.
- 64) VAN BAELEN H., HEYNS W., SCHONE E., DE MOOR P.:
An estradiol binding globulin in human serum:
partial purification.
Ann. Endocrin. (Paris) 29 (1968) 153.
zit. in 74)
- 65) VAN BAELEN H., BECK M., DE MOOR P.:
A cortisol-induced charge difference in desialylated human transcortin detected by isoelectric focusing.
J. Biol. Chem. 247 (1972) 2699-2703.

- 66) VERMEULEN A., VERDONCK L., VAN DER STRAETEN M., ORIE N.:
Capacity of the testosterone-binding globulin in human plasma and influence of specific binding of testosterone on its metabolic clearance rate.
J. Clin. Endocr. 29 (1969) 1470-1480.
- 67) VESTERBERG O.:
Isoelectric focusing of proteins in polyacrylamide gels.
Biochem. Biophys. Acta 257 (1972) 11-19.
- 68) VESTERBERG O., SVENSSON H.:
Isoelectric fractionation, analysis, and characterization of ampholytes in natural pH-gradients. IV. Further studies on the resolving power in connection with separation of myoglobins.
Acta Chem. Scand. 20 (1966) 820.
- 69) VOGT W., FISCHER I., EBENROTH S., APPEL S., KNEDEL M., LÜCKER P.W., RENNEKAMP H.:
Zur Pharmakokinetik von 9α -Fluorhydrocortison.
Arzneim.-Forsch. 21 (1971) 1133-1143.
- 70) VOGT W., LÜCKER P.W., KNEDEL M.:
Untersuchungen zur Pharmakokinetik von 9α -Fluorhydrocortison und ihre Bedeutung für die klinische Anwendung.
pp 69-80 in 57).
- 71) WARD S., WILSON D.L., GILLIAN J.J.:
Methods for fractionation and scintillation counting of radioisotope-labeled polyacrylamide gels.
Analyt. Biochem. 38 (1970) 90-97.
- 72) WENZL H., GARBE A., NOWAK H.:
Untersuchungen zur Pharmakokinetik von 9α -Fluorhydrocortison bei Ratte, Meerschweinchen und Hund.
Arzneim.-Forsch. 21 (1971) 1115-1122.

- 73) WENZL H., GARBE A., NOWAK H.:
Die Verteilung des 9 α -Fluorhydrocortison im tierischen Organismus.
Arzneim.-Forsch. 21 (1971) 1123-1126.
- 74) WESTPHAL U.:
Steroid-protein interactions.
Monographs on Endocrinology vol.4.
Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York 1971.
- 75) WESTPHAL U., BURTON R.M., HARDING G.B.:
Characterization of steroid-binding glycoproteins: methodological comments.
Methods in Enzymology vol.36, pp 91-104.
Academic Press, New York 1975.
- 76) WESTPHAL U., ASHLEY B.D., SELDEN G.L.:
Steroid-protein interactions:
VII. Interactions of progesterone and corticosteroids with human plasma proteins determined by multiple equilibrium dialysis.
Arch. Biochem. 92 (1961) 441.
zit. in 74).
- 77) WINTER A., PERLMUTTER H., DAVIES H.:
Preparative flat-bed electrofocusing in a granulated gel with the LKB 2117 Multiphor.
LKB Application Note 198, Bromma, Schweden, 1975.

9.

Lebenslauf

Am 28.12.1950 wurde ich in München als Sohn des Verwaltungsbeamten Lorenz Braun und seiner Ehefrau Magdalena, geb. Kieser geboren. Nach der Volksschule besuchte ich den mathematisch-naturwissenschaftlichen Zweig des Josef-Hofmiller-Gymnasiums in Freising. Dort legte ich im Jahr 1970 die Reifeprüfung ab. Anschließend studierte ich an der Universität München Humanmedizin. Nach dem Staatsexamen im Sommer 1976 war ich als Medizinalassistent zunächst 6 Monate in der chirurgischen Abteilung des Stadtkrankenhauses Traunstein und bis Oktober 1977 in der 4. Medizinischen Abteilung des Städt. Krankenhauses München-Harlaching tätig. Zur Zeit leiste ich meinen Grundwehrdienst als Stabsarzt bei der Bundeswehr.

Dissertations- und Fotodruck ANNELIESE SCHUBERT
Corneliusstraße 21 • 8000 München 5 • Telefon 268177

